

DAS MITOCHONDRIALE
CYTOCHROM B-GEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

MOLEKULARE STRUKTUR DES GENS UND
ANALYSE VON DELETIONSMUTANTEN

Alfred Ahne

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554819_0039

DAS MITOCHONDRIALE CYTOCHROM B-GEN
DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

MOLEKULARE STRUKTUR DES GENS
UND ANALYSE VON
DELETIONSMUTANTEN

Dissertation
der Fakultät für Biologie
durchgeführt am Institut für
Genetik und Mikrobiologie
der LMU-München

vorgelegt von
Alfred Ahne
München im November 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1985

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht bzw. sind in Bearbeitung:

Ahne, F., Merlos-Lange, A. M., Lang, B. F., Wolf, K.

(1984) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 5. Characterization of mitochondrial deletion mutants.

Curr. Genet. 8, 517-524

Ahne, F., Lang, B. F., Kaudewitz, F., Wolf, K.

(1985) Sequencing of mitochondrial deletion-mutants mapping in the cob-region of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In Vorber.

Lang, B. F., Ahne, F., Bonen, L.

(1985) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: The cytochrome b gene has an intron closely related to the first two introns in the *Saccharomyces cerevisiae* *cox1* gene.

J. Mol. Biol. 184, 353-366

Lang, B. F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H., Kaudewitz, F., Wolf, K.

(1983) Sequence of the mitochondrial DNA, arrangement of genes and processing of their transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. In: Mitochondria 1983. R. J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds., pp 313-329, Walter de Gruyter, Berlin-New York.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG.....	1
II. MATERIAL UND METHODEN.....	7
1. Material.....	7
1.1 Abkürzungen.....	7
1.2 Genetische Nomenklatur.....	8
1.3 Feinchemikalien.....	9
1.4 Radiochemikalien und Enzyme.....	10
1.5 Medien und Puffer.....	11
1.5.1 Medien.....	11
1.5.2 Puffer.....	11
1.6 Stämme und Klone.....	14
1.6.1 S. pombe-Stämme.....	14
1.6.2 Bakterienstämme.....	15
1.6.3 Plasmidstämme.....	16
2. Methoden.....	17
2.1 Anzucht von S. pombe-Zellen.....	17
2.2 Präparation von Mitochondrien.....	17
2.3 Extraktion mitochondrialer DNA.....	18
2.4 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.....	19
2.4.1 Restriktion.....	19
2.4.2 Gelelektrophorese.....	19
2.5 Reisolation von DNA-Fragmenten aus Gelen.....	20

2.6	Klonierung mitochondrialer DNA-Fragmente.....	20
2.6.1	Ligasereaktion.....	20
2.6.2	Transformation von E. coli-Zellen.....	21
2.7	Identifizierung von klonierter mt DNA in Zellen.....	21
2.8	Tropfhybridisierung von DNA.....	22
2.9	Southern-Hybridisierung.....	23
2.10	Nick-Translation.....	23
2.11	Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.12	Radioaktive Markierung von 3'-OH-Enden.....	24
2.13	Dephosphorylierung.....	25
2.14	Radioaktive Markierung von 5'-Enden.....	25
2.15	Strangtrennung von DNA.....	26
2.16	Sequenzierung von DNA.....	26
2.17	Computeranalyse.....	27

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1.	Sequenzuntersuchung des cob-Gens.....	28
1.1	Einführung.....	28
1.2	Feinstrukturkarte und Sequenzierung.....	31
1.3	Die Lage des S. pombe cob-Introns im Vergleich zu den cob-Introns anderer Pilze.....	35
1.4	Aus der DNA-Sequenz abgeleitete Struktur des Cytochrom b-Polypeptids und Vergleich mit homologen Proteinen.....	40
1.5	Die RNA-Sekundärstruktur des cob-Introns von S. pombe.....	44
1.6	Aminosäuresequenzvergleich des cob-Intron- Leserahmens mit anderen Intron-ORFs.....	51
1.7	Codonbenützung im cob-Gen.....	59

2.	Untersuchung von Deletionsmutanten im cob-Genbereich.....	62
2.1	Kurze Einleitung.....	62
2.2	Restriktionskartierung, Klonierung und DNA-Sequenzanalyse der Mutantenstämme.....	64
2.3	Einteilung der Mutanten.....	69
2.4	Verteilung von Deletionen auf dem mt Genom von S. pombe.....	70
2.5	Direkt repetierte Sequenzen an den Deletions- endpunkten.....	71
2.6	Deletionen an Exon-Intron-Grenzen.....	86
IV.	Zusammenfassung.....	95
V.	Literatur.....	99
VI.	Anhang: DNA-Sequenz des cob-Genbereiches von S. pombe.....	113

I. EINLEITUNG

Anfangs der 60er Jahre wurde die Entdeckung gemacht, daß Mitochondrien ein selbstreplizierendes DNA-Genom besitzen, welches das Mitochondrium zu einem teilautonomen System innerhalb einer eukaryontischen Zelle macht. Durch diese Entdeckung wurde das mitochondriale Genom zu einem interessanten genetischen System. Im Vergleich zum Genom des Kernes verfügt es nur über einen Bruchteil von dessen Codierungskapazität. Nur ca. 5% aller für ein funktionelles Mitochondrium notwendigen Proteine werden von ihm selbst synthetisiert. Bei allen bisher untersuchten mitochondrialen Genomen sind dies eine kleine Anzahl von Translationsprodukten, die am Aufbau der Atmungskette und am ATP-Synthesemechanismus beteiligt und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Es sind dies die drei größeren Untereinheiten des Cytochromoxidase-Komplexes, Apocytochrom b, sowie, abhängig vom jeweiligen Organismus, zwei oder drei Untereinheiten des ATPase-Komplexes (ATPase 6,-8,-9). Die Teilautonomie des Systems spiegelt sich darin wider, daß alle anderen Komponenten der äußeren und inneren Mitochondrienmembran, alle Enzyme, die in der Matrix lokalisiert sind, sowie alle Faktoren, die für die Replikation, Transkription und Translation benötigt werden, von den Chromosomen des Zellkerns codiert sind und nach Translation an cytoplasmatischen Ribosomen in die Mitochondrien importiert werden (Yaffe, 1983). In allen bisher untersuchten mitochon-

drialen Genomen sind außerdem alle RNA-Moleküle codiert, die für die selbständige mitochondriale Proteinbiosynthese-Maschinerie benötigt werden: Die große (large rRNA = lrRNA) und die kleine (small rRNA = srRNA) ribosomale RNA, sowie ein Satz von mindestens 22 tRNAs (Borst und Grivell, 1978; Tzagoloff et al., 1979).

Während die Grundausrüstung an Genen in der mitochondrialen DNA bei nahezu allen Organismen im Großen und Ganzen ähnlich ist, fallen hinsichtlich der Organisation, des Genaufbaus und der Genomlängen sogar innerhalb der Stämme einer Spezies zum Teil drastische Unterschiede auf. Die Genomgrößen bei Pflanzenmitochondrien variieren zwischen 100 Kilobasenpaaren (kbp) bis zu einigen tausend kbp (Bendich, 1982; Wallace, 1982), im Gegensatz dazu bewegen sich die Genomlängen von Säugetiermitochondrien bei nur ca. 16 kbp. (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981). Die größten Variationen finden sich bei den mitochondrialen Genomen der Pilze. Als Beispiele seien aufgeführt: Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) mit bis zu 78 kbp (Borst, 1981; Clark-Walker, 1981), *Neurospora crassa* (*N. crassa*) mit ca. 65 kbp (Macino, 1980), *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) mit ca. 32 kbp (Netzker et al., 1982) sowie *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) mit 19,4 kbp (Anziano et al., 1983; Lang & Wolf, 1984). Diese Größenunterschiede haben ihre Ursachen vor allem im Vorkommen oder Fehlen von DNA-Regionen innerhalb einzelner Spezies und Stämme, sowie Amplifikation von Sequenzen.

Verantwortlich dafür sind hauptsächlich:

-i) AT-reiche, nichtcodierende Sequenzen unterschiedlicher Länge zwischen einzelnen Genen (Spacer) bzw. GC-reiche Regionen (GC-cluster). Während z.B. die Gene bei *S. cerevisiae* durch lange Spacer getrennt sind (Borst und Grivell, 1981), vertreten Säugermitchondrien das krasse Gegenteil, da die Gene nur durch tRNA-codierende Sequenzen voneinander getrennt sind (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981).

-ii) das Vorhandensein von URFs (unassigned reading frames). Es handelt sich dabei um offene Leserahmen, welche die Codierungskapazität für ein Polypeptid besitzen, dessen Vorhandensein und Funktion jedoch noch nicht geklärt werden konnte. Im mitochondrialen Genom von *A. nidulans* wurden bisher 7 URFs gefunden (Brown et al., 1985), von denen vier mit den Genen für die Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L und ND5 in menschlichen Mitochondrien homolog sind (Chomyn et al., 1985). In *N. crassa* wurden vier URFs entdeckt (Burger und Werner, 1983; Burger, 1985; Breitenberger, 1985) während auf dem mt Genom von *S. pombe* nur ein URF (URFa) (Lang et al., 1983) nachgewiesen werden konnte.

iii) das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Gene: Während z.B. bei *S. cerevisiae* (Tzagoloff et al., 1983) und *S. pombe* (Goffeau et al., 1983) die Untereinheit 9 der ATPase auf dem mitochondrialen Genom codiert ist, ist das homologe Gen bei Säugern im Kern lokalisiert (Anderson et al., 1981;). Bei *N. crassa* wurden ATPase 9-Gensequenzen sowohl im Kern als auch auf der mitochondrialen DNA gefunden (Macino, 1980), wobei nur das Kerngen transkribiert und translatiert wird.

Bei *A. nidulans*, wo eine ähnliche Situation vorliegt, wird vermutet, daß die mitochondrial- und die kerncodierte Version in verschiedenen Wachstumszyklen exprimiert werden (Brown et al., 1984, 1985). Ein weiteres Beispiel für das variable Vorkommen von Genen auf mitochondrialen Genomen ist das *var1*-Gen. Während bei *S. cerevisiae* dieses Gen exprimiert wird (Hudspeth et al., 1982), fehlt es bei *A. nidulans* (Brown et al., 1985) und *S. pombe* (Lang und Wolf, 1984). In *Torulopsis glabrata* (Clark-Walker und Sriprihash, 1983) ist es dagegen vorhanden und wird wahrscheinlich auch transkribiert.

-iiii) das Vorkommen von Mosaikgenen.

Viele bisher untersuchte chromosomale Gene von Säugern, Vögeln, Amphibien und selbst von niederen Eukaryonten sind gestückelt, das heißt, die Protein-codierenden Sequenzen eines Gens (Exons) werden von Sequenzen unterbrochen (Introns), die keinen Codierungsinhalt für das entsprechende Gen beinhalten. Während Introns in chromosomalen Genen bis heute für nichts zu codieren scheinen (Grivell, 1983), konnte bei Hefe zum erstenmal nachgewiesen werden, daß in manchen Introns von mitochondrialen Genen Informationen codiert sind, die beim Herausschneiden der Introns aus der Vorläufer-RNA und dem Zusammenfügen der Exonanteile (Spleißen) benötigt werden, ein Vorgang, ohne den kein Mosaikgen exprimiert werden kann. Bisher konnten in allen Ascomyceten, von denen größere Teile des mt Genoms sequenziert worden sind, eine unterschiedliche, teils stamm-spezifische Anzahl von Introns mit offenen oder geschlossenen Leserahmen nachgewiesen werden (Bernardi, 1978; Borst, 1980).

Im Cytochrom b (cob)-Gen von *S. cerevisiae* sind bis zu 5 Introns enthalten (Grivell et al., 1980; Lazowska et al., 1980; Van Ommen et al., 1980), im Vergleich dazu *A. nidulans* mit einem cob-Intron (Waring et al., 1981, 1982, 1984) bzw. *N. crassa* mit zwei (Helmer-Citterich et al., 1983). Im cox1-Gen von *S. cerevisiae* sind bis zu 9 Introns vorhanden (Hensgens et al., 1983), bei *A. nidulans* zwei (Waring et al., 1981), bei *S. pombe* Stamm 50 ebenfalls zwei (Lang et al., 1983; Lang, 1984), während beim Stamm EF1 mit dem kürzeren mitochondrialen Genom im selben Gen 4 Introns enthalten sind (Trinkl & Wolf, 1985). Im cob-Gen dieses Stammes dagegen kommt kein Intron vor (Trinkl et al., 1985), während im Stamm 50 das cob-Gen von einem Intron unterbrochen wird. Hybridisierungsversuche von Lang und Wolf (1984) ergaben für das cob-Gen von *S. pombe* eine Länge von ca. 3,8 kbp. Das im Vergleich dazu nur ca. 1 kbp lange cob-Gen in menschlichen Mitochondrien (Anderson et al., 1981) ließ vermuten, daß bei *S. pombe* möglicherweise noch ein oder mehrere Introns im cob-Gen vorhanden sind.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das cob-Gen von *S. pombe* zu untersuchen und mögliche Introns zu klassifizieren. Grundlagen dafür sollte die Erstellung einer Feinstruktur-Restriktionskarte und die DNA-Sequenz des gesamten cob-Genbereiches bilden. Mit Hilfe der davon ableitbaren Aminosäuresequenz sollte im Vergleich mit anderen cob-Genen die evolutionäre Stellung von *S. pombe* charakterisiert werden und durch Hydrophobizitätsberechnungen versucht werden, Aussagen über die

Lage des Cytochrom b in der inneren Mitochondrienmembran zu treffen. Durch Analyse der abgeleiteten Intron-RNA-Sequenz und der Codonbenützung sollten Gemeinsamkeiten mit anderen untersuchten Introns herausgestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte durch Charakterisierung und Sequenzierung von Mutanten mit Deletionen im cob-Genbereich a) die Voraussetzung für die Untersuchung von Spleißmechanismen (S. Distler, Dissertation in Vorbereitung) geschaffen werden, b) sollten Mechanismen der Deletionsentstehung bei *S. pombe* im Vergleich zu bereits bestehenden Modellen untersucht werden. Durch die unterschiedlich deletierten DNA-Bereiche in den Exon- und Intronsequenzen sowie an den Spleißpunkten sollten mögliche Zusammenhänge zwischen Spleißen und Deletieren erfaßt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Abkürzungen

A	Adenosin
Amp	Ampicillin
A.n.	Aspergillus nidulans
ana ^r	Antimycin-resistent
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAP	Chloramphenicol
CIP	Kälberdarm-Phosphatase
CsCl	Cäsiumchlorid
diu ^r	Diuron-resistent
DNA(S)	Desoxyribonukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
E. coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
G	Guanin
I	Intron
kbp	Kilobasenpaare
m(M)	(Milli)mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt	mitochondrial
NaAc	Natriumacetat
N.c.	Neurospora crassa
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
P.a.	Podospora anserina
O.D.	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
S.c.	Saccharomyces cerevisiae
S.p.	Schizosaccharomyces pombe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standart-Saline-Citrat
STE	Natrium-Tris-EDTA
SUT	Sucrose-Tris
T	Thymin
TEB	Tris-EDTA-Borat
TES	Tris-EDTA-Natrium
Tet	Tetracyclin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
URF	Offener Leserahmen mit unbekannter Funktion
wt	Wildtyp
Z.m.	Zea mays

1.2 Genetische Nomenklatur

aap1	Gen für ATPase Untereinheit 8
cob	" Apocytochrom b
cox1,-2,-3	" Untereinheiten I, II, III der Cytochrom c Oxidase
oli 1	" ATPase Untereinheit 9
oli 2	" ATPase Untereinheit 6
1rRNA	" Große ribosomale RNA
srRNA	" Kleine ribosomale RNA
tRNA	" Transfer-Ribonukleinsäure
mit-	Punktmutation oder Deletion im mitochondrialen Genom, welche Atmungs- defizienz bewirkt. Proteinsynthese ist noch intakt.
rho-	Makrodeletion im mitochondrialen Genom bewirkt Atmungsdefizienz. Protein- synthese nicht mehr intakt.
rho ^o	Deletion des gesamten mitochon- drialen Genoms.

1.3 Feinchemikalien

Soweit nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien von der Firma Merck bezogen.

Acrylamid	Serva/Heidelberg
Agar	Difco/Detroit
Agarose	BRL Maryland U.S.A.
Agfapan-100 Film	Agfa Gevaert, Leverkusen
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bisbenzimid	Riedel de Haen/Hannover
Caesiumchlorid	Baker Chemicals, Denveter, Holland
Chloramphenicol	Bayer, Leverkusen
DNA aus Heringsperma	Boehringer, Mannheim
DMS	Fluka AG, Buchs, Schweiz
EB	Sigma, St.Louis, USA
EDTA	Baker Chemicals
Formamid	Fluka, Schweiz
Glucose	Hedinger, Stuttgart
Hydrazin	Eastman Organic Chemicals
Methylquecksilberhydroxid	Ventron, Karlsruhe
Mutanase	Novo Industries, Kopenhagen, DK
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
N.N.Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Piperidin	Sigma, St.Loie
SDS	Serva, Heidelberg
Spermidin	Sigma, St.Loie U.S.A.
tRNA aus E. coli	Boehringer, Mannheim
Tris	Sigma, St.Loie U.S.A.
Hefeextrakt	Difco, Detroit U.S.A.

1.4 Radiochemikalien und Enzyme

Radioisotope	New England Nuclear, Dreieich, BRD Amersham-Buchler, Braunschweig
DNA-Polymerase I	BRL, Maryland, U.S.A.
Kälberdarm-Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Kleenow-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Novozym-234	Spende der Novo Industries, Dänemark
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim BRL, Maryland, U.S.A. Biolabs
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotid- kinase	Boehringer, Mannheim

1.5 Medien und Puffer

1.5.1 Medien

YD	2 %	Hefeextrakt
	3 %	Glucose
	70 µg/ml	Penicillin
	10 µg/ml	Adeninsulfat
	2 %	Agar (bei Platten)
LB	10,0 g	Trypton
	5,0 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	1,25ml	NaOH (5N)
	2,5 ml	Glycerin
	20,0 g	Agar, kein Glycerin bei Platten
TYKPi	100,0 g	Trypton
	50,0 g	Hefeextrakt
	11,5 g	K ₂ HPO ₄
		auf 1l Wasser auffüllen

Antibiotika:

Zugabe zu Flüssigmedien bzw. Platten

120,0 µg/ml	Ampicillin
15,0 µg/ml	Tetracyclin
25,0 µg/ml	Chloramphenicol

1.5.2 Puffer

Präparationspuffer für Mitochondrien:

0,75 M Sorbitol
20 mM EDTA
50 mM Phosphat/Citrat pH 5,6-5,7

TE-Puffer:

10 mM Tris
1 mM EDTA pH mit HCl einstellen

Neutralisationspuffer:

0,5 M NaCl
0,12 M HCl
0,125M Tris-HCl pH 7,5

20xSSC:

3,0 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
mit Citronensäure auf pH 7,2
einstellen

20xDenhardt's:

0,4 % Ficoll
0,4 % BSA
0,4 % Polyvinylpyrrolidon (MG=360000)

Waschpuffer:

0,1 % SSC
0,1 % SDS
50 µg/ml Heringsperma-DNA

Nicktranslationspuffer:

0,5 M Tris-HCl pH 7,2
0,1 M MgSO₄
1 mM Dithiothreitol

Kinase-Puffer I:

0,5 M Tris-HCl pH 7,6
0,1 M MgCl₂
50 mM Dithiothreitol
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

Kinase-Kochpuffer:

0,2 M Tris-HCl pH 9,5
10 mM Spermidin
1 mM EDTA

Blunt-Kinase-Puffer:

0,5 M Tris-HCl pH 9,5
0,1 M MgCl₂
50 mM Dithiothreitol
50 % Glycerin

Ligase-Puffer:

0,66 M	Tris-HCl pH 7,6
50 mM	MgCl ₂
50 mM	Dithiothreitol
10 mM	ATP

Strangtrennungspuffer:

100 %	Formamid (deionisiert)
0,1 %	(w/v) Xylen-Cyanol
0,1 %	(w/v) Bromphenolblau
3,3 %	Methylquecksilber

Restriktions-Stopp-Puffer:

0,5 mg/ml	Bromphenolblau
50 %	Glycerin
10 M	Harnstoff

1.6 Stämme und Klone

1.6.1 Schizosaccharomyces-Stämme:

-ade7-50h⁻ U. Leupold, Bern

Die Deletionsmutanten stammen von
den Stämmen

-ana ^r -8	Lang et al. (1975)
-ana ^r -14	Burger & Wolf (1981)
-diu ^r -301	Burger & Wolf (1981)

1.6.2 Bakterienstämme:

E. coli HB 101	recA ⁻ ,rk ⁻ ,mk ⁻	H.W. Boyer, San Francisco
----------------	---	------------------------------

1.6.3 Plasmidstämme

Beschreibung der Plasmide, in denen mitochondriale Fragmente
enthalten sind (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Plasmidname:	Vektor:	Mitochondriales Fragment:	Stamm:	Position: auf dem at Genom	Deletions- länge in Basenpaaren:	Insert- länge in Basenpaaren:	Herkunft:
pFM 141	paCYC184	EcoRI-4	50	8700-10400	-	1700	Lang und Wolf, 1984
pFM 71	pBR 322	EcoRI-1/HindIII-4	50	7150- 8700	-	1550	"
pFM 72	pBR 322	EcoRI-4/HindIII-4	50	8700- 9600	-	900	"
pFM 52	pBR 322	HindIII-3/BamHI	50	9700-11100	-	1400	"
pFM 51	pBR 322	BamHI/HindIII-3	50	11100-13100	-	2000	"
pAM 4	paCYC184	EcoRI-2	EB 4	12745-15262	541	1976	diese Arbeit
pAM 5	paCYC184	EcoRI-2	EB 5	12745-15262	219	2298	"
pAM 7	paCYC184	EcoRI-2	EB 7	12745-15262	541	1976	"
pAM 9	pBR 322	BglII-7	EB 9	12692-13217	37	488	"
pAM 11	paCYC184	EcoRI-2	EB 11	12745-15262	541	1976	"
pAM 20	pBR 322	HindIII-4/EcoRI	SP 20a	9511-11051	724	816	"
pAM 49	paCYC184	EcoRI-4	SP 49b	11051-12745	420	1274	"
pAM 130	pBR 322	HindIII-4/EcoRI	diu 130	9511-11051	498	1042	"
pAM 145	pBR 322	HindIII-4/EcoRI	diu 145	9511-11051	46	1494	"
pAM 272	Puc 8	EcoRI-4	SP 272	11051-12745	34	1560	"

Die Positionen, an denen die at Fragmente auf dem Wildtypgenom beginnen und enden sind in Transkriptionsrichtung angegeben. Als Nullpunkt wurde die Sal I-Schnittstelle definiert.

2. Methoden

2.1 Anzucht von *S. pombe*-Zellen

Für die Anzucht von *S. pombe*-Stämmen wurden frisch gewachsene Einzelkolonien von YD-Platten isoliert und damit das Anzuchtmedium beimpft. Danach erfolgte eine Inkubation bei 30°C unter guter Belüftung. Nach Erreichen der stationären Phase wurden nochmals 3% bis 5 % Glucose zugegeben, um die Zellen wieder zu logarithmischem Wachstum anzuregen. Diese Prozedur wurde bei einigen Mutantenstämmen mehrmals wiederholt, da sich die Mitochondrienausbeute dadurch erhöhen ließ. Am Tage der Präparation wurden die Zellen in frisches Wachstumsmedium überführt und solange gut belüftet, bis ca. bei 80% der Zellen Teilungsstriche sichtbar waren. In diesem Stadium wurden die Zellen aufgeschlossen.

2.2 Präparation von Mitochondrien

Nach Abzentrifugieren wurden die Zellen aus 100 ml Anzuchtkultur in 5 ml Sorbitol/Citratpuffer suspendiert und mit 10 mg Novozym sowie 1 ml Mercaptoethanol versetzt und bei 30°C langsam geschüttelt. Nachdem Protoplastierung bei 60% bis 90 % aller Zellen im Mikroskop sichtbar war, wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert (1 Min. bei 6000 rpm; GSA-Rotor), der Überstand auf Eis gestellt und das Pellet mit Sorbitolpuffer und Glasperlen vermischt, bis eine zähflüssige Konsistenz erreicht wurde. Der Aufschluß der Protoplasten erfolgte mechanisch durch Schütteln im Becherglas. Die Glasperlen wurden mehrmals mit Sorbitolpuffer nachgewaschen, der Überstand 3 Min. bei 6000 rpm abzentrifugiert und mit dem ersten Überstand vereint. Durch halbstündiges Zentrifugieren bei 20000 rpm wurden die Mitochondrien pelletiert. Zur Reinigung

der Mitochondrien von cytoplasmatischen Bestandteilen wurde das Pellet nochmals in Sorbitolpuffer suspendiert und auf einen Dichtegradienten, der aus 5 ml 80% und 5 ml 40% Glycerin bestand, aufgeschichtet. Nach 30 Min. Zentrifugation in einem SW-27-Rotor bei 23000 rpm konnte die braun erscheinende Mitochondrienbande mit einer Pipette abgenommen werden.

2.3 Extraktion mitochondrialer DNA

Die gereinigten Mitochondrien wurden nochmals in 20 ml Sorbitolpuffer aufgenommen und 20 Min. bei 20000 rpm zentrifugiert (Glycerin wird dadurch entfernt). Das Pellet wurde in einigen ml TE suspendiert und mit SDS-Lösung (Noll et al. 1968) bis zu einer Endkonzentration von 2 % versetzt. Nach vollständiger Klärung der Suspension erfolgte eine mehrmalige Phenol/Chloroform-Extraktion, bis keine Proteinzwischenschicht mehr sichtbar war. Der Überstand wurde mit Ethanol gefällt und das Pellet nach Zentrifugation in TE gelöst, das danach mit 1,1 g CsCl /ml versetzt wurde. Der gelösten DNA wurde 1 µg/ml Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Müller et al., 1975) zugegeben. Nach Zentrifugation bei 40000 rpm im Ti-70 Beckmann-Rotor kann nach 48 Stunden die durch Bisbenzimid in UV-Licht fluoreszierende mt DNA-Bande durch Einstechen einer Kanüle in das Zentrifugenröhrchen mit einer Injektionsspritze abgenommen werden. Durch den hohen AT-Gehalt und der dadurch geringeren Schwimmdichte liegt die mt DNA-Bande über der GC-reicheren Kern-DNA, die als Verunreinigung meist nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

2.4 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese von DNA

2.4.1 Restriktion

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte entsprechend den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller unter Verwendung der darin beschriebenen Restriktionspuffer. Pro μg DNA wurden bei analytischen Schnitten 1-2 Einheiten Enzym verwendet. Bei präparativem Restriktionsverdau wurden 1/10 der notwendigen Enzymmenge eingesetzt und dafür die Inkubationsdauer heraufgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/3 Volumen Stopplösung abgebrochen.

2.4.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarose- bzw. bei präparativen Schnitten in 6%igen Acrylamidgelen bei einer Spannung von ca. 7V/cm Laufstrecke. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden Eichmarker als Parallelproben coelektrophoretisiert. (P22-DNA mit Eco RI bzw. pBR 322 mit Hinf I + Hind III restringiert). Nach Anfärben der Gele mit EB-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden die Gele im UV-Durchlicht mit einem "Durst-Laborator" fotografiert.

2.5 Reisolation von DNA-Fragmenten aus Gelen

Die Reisolation der DNA aus der Gelmatrix erfolgte durch Elektroelution in Dialyseschläuchen bei 100 Volt (Mc Donnel et al., 1977). Zur Entfernung von Agarose- bzw. Acrylamid-Verunreinigungen erfolgte eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließend Ethanolpräzipitation.

2.6 Klonierung mitochondrialer DNA-Fragmente

2.6.1 Ligasereaktion

Vor der gezielten Klonierung wurden DNA-Fragmente, die aus Agarosegelen isoliert wurden, als zusätzlichen Reinigungsschritt in einem CsCl -Dichtegradienten bandiert. Für ungezielte Klonierung wurde die DNA nach Restriktion Phenol/Chloroform-extrahiert und nach Ethanolpräzipitation direkt der Ligasereaktion unterzogen. Die Ligation von Spender-DNA und Empfänger-DNA erfolgte im Mischungsverhältnis 4:1 über Nacht in Ligationspuffer bei einer Temperatur von 14°C. Bei überhängenden Enden wurde eine Enzymeinheit T4-DNA-Ligase, bei glatten Enden 10 Enzymeinheiten pro Reaktionsgemisch eingesetzt.

Reaktionsansatz: (nach Maniatis et al., 1983)

- 2 µg Vektor-DNA
- 8 µg Donor -DNA
- 18 µl Wasser
- 2 µl Ligasepuffer 10x
- 1(10) U T4-DNA-Ligase

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl 0,5 M EDTA und Erhitzen des Gemisches auf 65°C gestoppt.

2.6.2 Transformation von E. coli-Zellen

Die Transformation von E. coli erfolgte nach der Calciumchloridmethode. Dabei wurde eine Übernachtskultur von E. coli in LBG-Medium 10-fach verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (O.D.) von 0.6 unter guter Belüftung bei 37°C bebrütet. Nach 10 Min. Inkubation auf Eis und 5 Min. Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das Zellpellet im halben Züchtungsvolumen Calciumchlorid (0,1 M) suspendiert und nochmals 20 Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte erneute Zentrifugation und Suspension des Pellets in 1/20 bis 1/40 des Züchtungsvolumens. Zu 0,2 ml kompetenten Zellen wurden bis zu 40 ng Vektor-DNA (verdünnt in 100 µl Ligationspuffer) zugegeben und auf Eis gestellt. Nach 30 Min. erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock im vorgeheizten Wasserbad (42°C). Danach wurde 1 ml vorgewärmtes LBG zugegeben und die Zellen bei 37°C 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde auf die jeweiligen Antibiotika-Platten ausplattiert.

2.7 Identifizierung von klonierter mt DNA in transformierten E. coli-Zellen

Die Selektion nach inserierten mt DNA-Fragmenten in transformierten E. coli Zellen erfolgte bei ungezielter Klonierung durch Koloniehybridisierung nach Grundstein et al. (1975). Dazu wurden Einzelkolonien des aufplattierten Transformationsgemisches mit sterilen Zahnstochern auf steriles Nitrocellulosepapier transferiert und auf YNB-Antibiotikaplatten bei 37°C ca. sechs Stunden bebrütet, bis die Zellen gut angewachsen waren. Zur Amplifikation der Plasmide wurde das Filter-

papier mit den Zellen auf YNB-Platten transferiert, die Chloramphenicol (150 µg/ml) enthielten und bei 37°C mindestens 12 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellkolonien markiert und auf 3MM-Papier 7 Minuten mit 0,5 N NaOH lysiert. Es folgten zwei Waschschriffe von jeweils 2 Minuten mit 1 M Tris (pH 7,5) und eine Behandlung mit 1,5 M NaCl in 0,5 M Tris (pH 7,5) von 4 Min. Dauer. Nach Trocknung der Filter erfolgte zur Entfernung von Proteinen eine Verdauung mit Proteinase-K (100 µg/ml in 1xSSC, 20 Min.). Anschließend wurden die Filter nacheinander kurz in EtOH, Chloroform und 0,3 M NaCl getaucht. Zur Fixierung der DNA auf den Nitrocellulosefiltern wurde diese abschließend zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

2.8 Tropfhybridisierung von DNA

Neben der beschriebenen Koloniehybridisierung wurden klonierte DNA-Fragmente auch durch direktes Auftropfen von DNA-Lösung auf Nitrocellulosefilter (Parnes et al., 1981) und anschließendes Hybridisieren identifiziert. Dabei wurde getrocknete DNA mit Wasser auf eine Konzentration von 500 µg/ml verdünnt und 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Probe 1:1 mit 1M NaOH verdünnt und bei Raumtemperatur 20 Min. inkubiert. Nach Zugabe von 1/2 Probevolumen Neutralisationspuffer wurde die DNA-Lösung tropfenweise auf Nitrocellulosefilter aufgetragen. Durch Trocknen bei 80°C für zwei Stunden wurde die DNA an das Filter gebunden und bis zur Hybridisierung in Plastikfolie eingeschweißt.

2.9 Hybridisierung nitrocellulosegebundener DNA mit radioaktiv-markierter DNA

Nach der Methode von Southern wurden die Nitrocellulosefilter zunächst bei 60°C vorinkubiert in $3\times$ SSC, 30 Min., $3\times$ Denhardt's, 30 Min. und in Hybridisierungslösung, 60 Min. . Danach wurden die Filter zusammen mit 2-3 ml Hybridisierungslösung sowie denaturierter radioaktiver DNA-Probe (5 Min. kochen, 5 Min. Eiswasser) in Plastikfolie eingeschweißt und 16 Stunden bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Entfernung von unspezifisch oder nicht gebundener radioaktiv markierter DNA erfolgten 6 Waschungen von jeweils 5 Min. in Hybridisierungslösung und anschließend zwei (15 Min.) in Waschpuffer. Nach Trocknen wurden die Filter erneut eingeschweißt und auf Röntgenfilm exponiert.

2.10 Nick-Translation von DNA-Fragmenten

Die Herstellung radioaktiv-markierter DNA für Hybridisierungen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Rigby et al. (1977) mit einigen Variationen: Es wurde keine Behandlung mit DNase durchgeführt, da in der eingesetzten DNA durch mechanische Beanspruchung bei der DNA-Präparation schon Einzelstrangbrüche auftreten, und in der verwendeten DNA-Polymerase noch Spuren von Exonukleasen enthalten waren. Die Inkubationsdauer betrug 3 Stunden bei einer Temperatur von 18°C . Die nicht eingebauten radioaktiven Triphosphate wurden nicht über eine Sephadexsäule abgetrennt, sondern durch zweimalige Ethanolpräzipitation, wobei diese Triphosphate im Überstand zurückbleiben. Die Einbaurate wurde durch Messung nach Cerenkow im Tritiumkanal eines Szintillationszählers ermittelt.

2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte in Anlehnung an die Methode von Clewell (1972). Nach Anzucht bis zur stationären Phase in TYKPi-Medium wurden die Bakterienzellen bei 12000 rpm 15 Min. abzentrifugiert und in SUT-Puffer gewaschen (15 ml/l Anzuchtkultur). Nach erneutem Abzentrifugieren bei 12000 rpm (5 Min.) wurden die Zellen in 10 ml TES-Puffer pro Gramm Naßgewicht suspendiert. Die Lyse der Zellwände wurde durch Zugabe einer Lösung von 40 mg Lysozym in 20 ml TES-Puffer eingeleitet (jeweils pro Gramm Naßgewicht). Nach 5 Minuten wurden 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8) zupipettiert, nach weiteren 10 Min. 0,5 ml Chloroform und 15 ml Lysemix. Nach 15 Min. wurde das Lysat in GSA-Bechern 30 Min. lang bei 12000 rpm abzentrifugiert. Dabei werden Zellwandbestandteile und bakterielle DNA pelletiert, während Plasmid-DNA zusammen mit Proteinbestandteilen im Überstand enthalten sind. Die Entfernung der Proteine erfolgte durch mehrmalige Phenol/Chloroform-Extraktionen, bis eine völlig klare Konsistenz erreicht war. Durch Zugabe von Ammoniumacetat (Endkonzentration 1M) und 0,6 Volumen Isopropanol wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und nach Abzentrifugieren und Lösen in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten weiter gereinigt.

2.12 Markierung von 3'OH-Enden mit Kleenow-DNA-Polymerase und radioaktivem ^{32}P -dNTP.

Kleenow-Polymerase ist eine Enzymfraktion der DNA-Polymerase I, bei der die 5'->3'-Exonukleaseaktivität abgetrennt wurde. Die Markierung erfolgte in folgendem Ansatz, beschrieben in Maniatis (1983).

- 10 µg getrocknete DNA in 18 µl Wasser
- 2 µl Kleenowpuffer
- 2 U Kleenow-Polymerase
- 10 µCi alpha- ^{32}P -dNTP

Nach 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 2 μ l 0,5 M EDTA gestoppt. Die Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Triphosphate erfolgte durch zweimalige Ethanolpräzipitation.

2.13 Dephosphorylierung von DNA nach Maniatis (1983)

Phenol/Chloroform-extrahierte und Ethanol-präzipitierte DNA (50 μ g) wurde in 45 μ l 10 mM Tris (pH 8,0) und 5 μ l CIP-Puffer zusammen mit 2 U CIP bei 37°C 30 Min. inkubiert. Danach wurden nochmals 2 U CIP zugegeben und weitere 30 Min. inkubiert. Für Fragmente mit glatten Enden oder überhängenden 3'-Enden wurde zuerst 15 Min. bei 37°C inkubiert, dann erfolgte eine Inkubation von 15 Min. bei 56°C. Nach Zugabe von 2U CIP wurde die ganze Prozedur nochmals wiederholt. Die Inaktivierung und Entfernung von CIP erfolgte nach Zugabe von 40 μ l Wasser, 10 μ l STE-Puffer (10x) sowie 5 μ l 10% SDS-Lösung durch Erhitzen auf 68°C (15 Min). Danach erfolgte eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation mit EtOH+NaAc.

2.14 Markierung von DNA an 5'-Enden

Die Markierung von 5'-überhängenden Enden erfolgte ebenfalls im wesentlichen nach der Methode, die in Maniatis (1983) beschrieben ist. Dabei wurden 50 μ g dephosphorylierte DNA in einem Ansatz, bestehend aus 2 μ l Kinasepuffer, 10 μ Ci/Ende 32 -P-gamma-ATP, 2 μ l Kinasepuffer I und 1 Enzymeinheit T4-Polynukleotidkinase mit einem Endvolumen von 20 μ l für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines Überschusses an EDTA und Fällung mit EtOH + NH₄Ac. Bei Vorliegen von glatten Enden wurde die DNA in Kochpuffer aufgenommen und nach Erhitzen auf 90°C für zwei Min. in

flüssigem Stickstoff gefroren. Durch Zugabe von blunt-Kinase-puffer im Volumenverhältnis 1:1 statt 1:10 konnte in Abweichung vom Originalprotokoll die Einbaurate an radioaktivem Phosphat ebenfalls um den Faktor 10 gesteigert werden und kommt so den Einbauraten bei überhängenden 5'-Enden gleich. Der Einsatz an Polynukleotidkinase betrug 2 U/Ende, von ^{32}P -gamma-ATP 10 μCi /Ende.

2.15 Strangtrennung von DNA

Die Aufrennung von doppelsträngiger DNA in Einzelstränge erfolgte durch Inkubation der DNA in Strangtrennungspuffer für 30 Min. bei 90°C . Anschließend wurde das Strangtrennungsgemisch 5 Minuten lang auf einem Vortex-Schüttler behandelt und sofort auf ein 40 cm langes, 6%-Acrylamidgel aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte bei 500 V für 6 Stunden bei 4°C .

2.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der endmarkierten DNA erfolgte nach der Methode nach Maxam und Gilbert (1980). Zusätzlich zu den vier "klassischen" Sequenzreaktionen wurde noch eine A>C Reaktion durchgeführt, wodurch ein höheres Auflösungsvermögen im oberen Bereich der Sequenzgele erreicht wurde. Die fertigen Sequenzreaktionen wurden auf 0,3 mm dicke, 60 cm lange denaturierende Acrylamidgele aufgetragen, die nach der Methode von Garoff und Ansorge (1981) vorbehandelt wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 3000 V.

2.17 Computeranalyse

Die Bestimmung der Hydrophobizitätsmuster erfolgte nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982), außer daß der Durchschnittswert für eine Strecke von Aminosäuren ermittelt wurde, die kürzer als die Spannbreite war. Dadurch wurde eine höhere Auflösung der Profile erreicht (Spannbreite=11, Durchschnittswert von 5 Aminosäuren). Das Computerprogramm wurde in Microsoft Fortran-77 für einen Sirius-1-Computer von B.F. Lang umgeschrieben. Die lokalen Proteinsekundärstrukturen wurden nach Garnier (1978) auf einem Cyber-Computer von B.F. Lang und L. Bonen (Halifax, Canada) ermittelt, der freundlicherweise von R.J. Cedergren (Montreal, Canada) zur Verfügung gestellt wurde.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Sequenzuntersuchung des cob-Gens von S. pombe Stamm 50

1.1 Kurze Einführung

Eine grundsätzliche Frage bei den Untersuchungen war, ob all die mitochondrialen Gene, die ausnahmslos in anderen Ascomyceten gefunden worden sind, auch im mt Genom von *S. pombe* (Stamm 50) vorhanden waren. Genkartierungsstudien durch Hybridisierung mit mitochondrialen DNA-Fragmenten aus *S. cerevisiae* (Lang und Wolf, 1984) und Bestimmung der gesamten DNA-Sequenz (Lang et al. 1983, Lang 1984, Trinkl et al., Manuskript in Vorb. und B.F. Lang, unveröffentlichte Daten) haben ergeben, daß dies der Fall ist. Die Gene für die Cytochromoxidase-Untereinheiten 1, 2 und 3 (cox1, cox2, cox3), Apocytochrom b (cob), die ATPase-Untereinheiten 6 und 8, die zwei ribosomalen rRNAs und ein Satz von 25 tRNAs sind vorhanden. Zusätzlich wurden auf dem mt Genom von *S. pombe* das Gen für die ATPase-Untereinheit 9 und ein intergenischer Leserahmen (URF a) identifiziert, dessen Funktion noch nicht bekannt ist. Dazu kommt, daß sowohl das cox1-Gen als auch das cob-Gen von zwei bzw. einem Intron unterbrochen sind, die zusammen eine Länge von 4,8 kbp haben und somit rund 25% der Gesamtgenomlänge einnehmen. Diese Introns unterscheiden sich hauptsächlich dadurch von den im Kern vorkommenden Introns, daß an den Exon/Introngrenzen keine Consensussequenzen angetroffen werden, (GU-Regel, d.h. daß Introns immer mit GU beginnen und mit AG

enden) und in den Introns von Mitochondrien offene Leserahmen vorkommen können, welche die Codierungskapazität für Polypeptide besitzen. Dafür lassen sich die Intronsequenzen in unterschiedliche RNA-Sekundärstrukturen falten (Michel et al. 1982; Waring et al. 1982). Es gibt gewichtige Anhaltspunkte dafür, daß solche Intron-Faltstrukturen maßgeblich für RNA-Spleißen sind (Weiss-Brummer et al., 1982; Dujardin et al., 1982; Anziano et al., 1982; Schmelzer et al., 1983), ein Vorgang, bei dem zur Expression des Gens die Intronsequenzen aus der Prä-mRNA des jeweiligen Gens herausgeschnitten und die Enden der Exonanteile verknüpft werden müssen. Anhand charakteristischer Eigenschaften solcher Sekundärstrukturen und konservierter Sequenzen lassen sich die mitochondrialen Introns in zwei Hauptgruppen einteilen (Michel et al., 1982; Michel und Dujon, 1983). Bis jetzt konnten insgesamt drei Introns mit langen offenen Leserahmen der Gruppe II zugeteilt werden. Es sind dies die ersten zwei Introns im *cox1*-Gen in *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980; Michel et al., 1982) und das erste *cox1*-Intron in *Podospora anserina* (*P. anserina*) (Osiewacz und Esser, 1984). Kürzere Gruppe II-Introns ohne offene Leserahmen wurden in Chloroplasten-Genomen von Mais (in den tRNA-Genen für Isoleucin und Alanin) gefunden (Koch et al., 1981), sowie in mitochondrialen *cox2*-Genen höherer Pflanzen (Fox und Leaver 1981; Bonen et al., 1984; Kao et al., 1984). Dazu lassen sich noch das weiter entfernt verwandte erste *cob*-Intron (*bI1*), sowie das fünfte *cox1*-Intron (*aI5*) von *S. cerevisiae* zählen (Michel und Dujon 1983; Lazowska et al. 1980; Bonitz et al.,

1980). Die Charakteristika dieser Gruppe von Introns bestehen in a) dem Vorhandensein hochkonservierter Sequenzen an den 3'-Enden; b) der Möglichkeit, lange Bereiche der RNA in Sekundärstrukturen zu falten, die hochkonservierte Nukleotide in der Kernstruktur enthalten, wenn man die *S. cerevisiae* Introns b11 und a15 dabei ausschließt (Michel et al., 1983). Zur größeren Gruppe I lassen sich die cob-Introns 2 bis 5, die cox1-Introns 3 und 4, das 1rRNA-Intron in *S. cerevisiae*, die zwei cox1-Introns in *S. pombe* Stamm 50 (Lang, 1984) und zwei zusätzliche cox1-Introns im Stamm EF1 (Trinkl und Wolf, 1985), sowie alle anderen Introns von Ascomyceten, die bisher untersucht wurden, zuordnen. Im Gegensatz zu den Gruppe II-Introns besitzen Gruppe I-ORFs konservierte Bereiche auf Aminosäureebene, hauptsächlich zwei Dekapeptide, sogenannte "LAGLI-DADG"-Motive (nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren bezeichnet) (Waring et al. 1982; Hensgens et al. 1983), denen funktionelle Bedeutung an den Spleißreaktionen zugesprochen wird. Diese Charakteristika deuten auf einen gemeinsamen Vorfahren hin.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die offenen Leserahmen (ORFs) der Gruppe II-Introns auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz sollte eine Suche nach Proteindomänen in den ORF enthaltenden Gruppe II-Introns ermöglichen.

1.2 Feinstrukturkarte und Sequenzierung der cob-Region von S. pombe.

Von Lang und Wolf (1983) konnte aufgrund interspezifischer Hybridisierungen mit DNA-Proben aus ρ^- -Stämmen, welche Teile des cob-Gens von *S. cerevisiae* enthielten, gezeigt werden, daß das cob-Gen von *S. pombe* innerhalb der Restriktionsfragmente Hind III-3 und Hind III-4 positioniert ist (Abb. 1a, 1b, 2). Für die Sequenzierung dieses Bereiches nach Maxam und Gilbert war es notwendig, zunächst eine Feinstrukturkarte dieser Region zu erstellen. Als Ausgangsmaterial dazu dienten die in pBR 322 einklonierten Hind III-Fragmente Nr.3 und Nr.4, sowie das Eco RI-Fragment Nr.4, welches in das Chloramphenicol-Resistenzgen des Plasmides paCYC 184 (Chang und Cohen, 1978) einkloniert worden war (Lang und Wolf, 1984). Zur Erstellung der Restriktionskarte wurden die in Abb. 2 eingezeichneten Enzyme verwendet. In den Abbildungen 1a, 1b und 2 sind die Lage der cob-Region auf dem mitochondrialen Genom von *S. pombe* und die Feinstruktur-Restriktionskarte des cob-Gens dargestellt. Die Positionen der Exon-Teile und des dazwischenliegenden Introns, sowie zwei flankierende tRNA-Gene, codierend für Threonin-tRNA und Methionin-tRNA (B.F. Lang, nichtveröffentlichte Daten) sind eingezeichnet. Die DNA-Sequenz des cob-Gens ist in Abbildung 3 dargestellt (Beiblatt, letzte Seite). Die Länge der zwei Exonanteile beträgt 684 bzw. 477 Nukleotide, die Länge des Introns 2526 Basenpaare. Der A+T-Gehalt der mitochondrialen DNA von *S. pombe* beträgt 70,4% für die Exonanteile und 67,3% für das Intron, im Gegensatz zu dem geringen A+T-Gehalt von *S. pombe* Kerngenen (50%) (Russel und Hall, 1983).

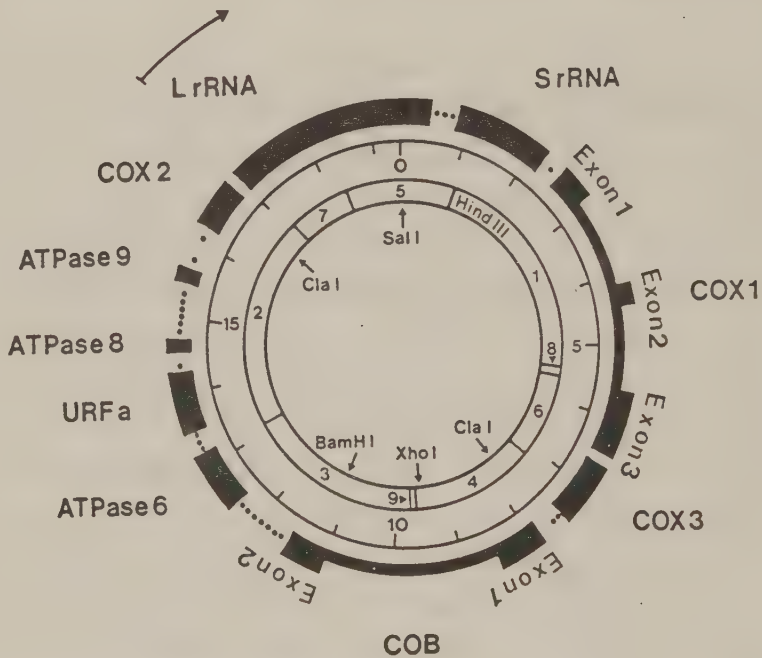


Abb. 1a:

Physische Karte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm 50. Im äußeren Kreis ist die Lokalisation der einzelnen Gene dargestellt. Die dicken Balken entsprechen dabei den Strukturgenbereichen, die dünnen Balken stellen Introns dar. Die tRNA-Gene sind als Punkte eingezeichnet. Als Anhaltspunkt sind die Sal I-Restriktionsstelle (Nullpunkt) sowie die Restriktionskarte für das Enzym Hind III angegeben. Die Daten sind entnommen aus Lang et al. (1983), Lang und Wolf (1984) und B. F. Lang, unveröffentl. Daten.

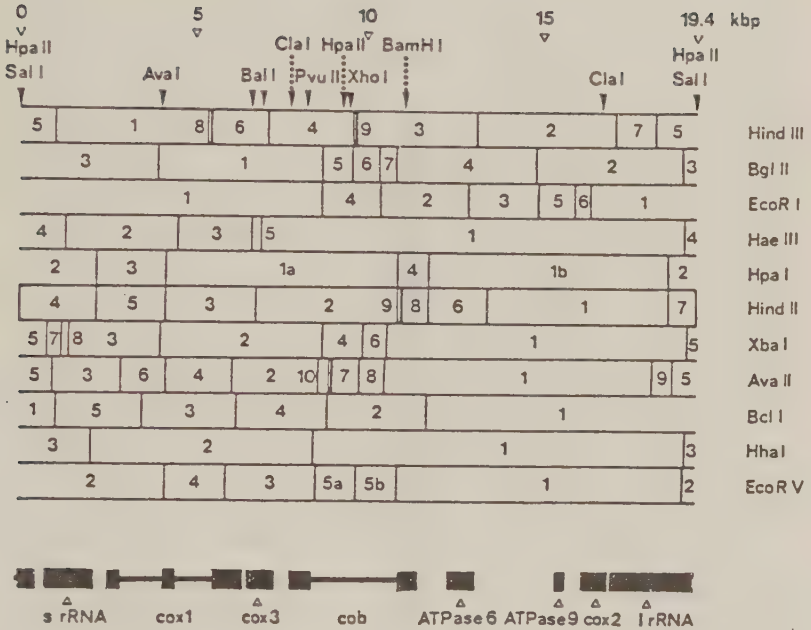


Abb. 1b:

Restriktionskarte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm 50. (Daten entnommen aus Lang und Wolf (1984)).

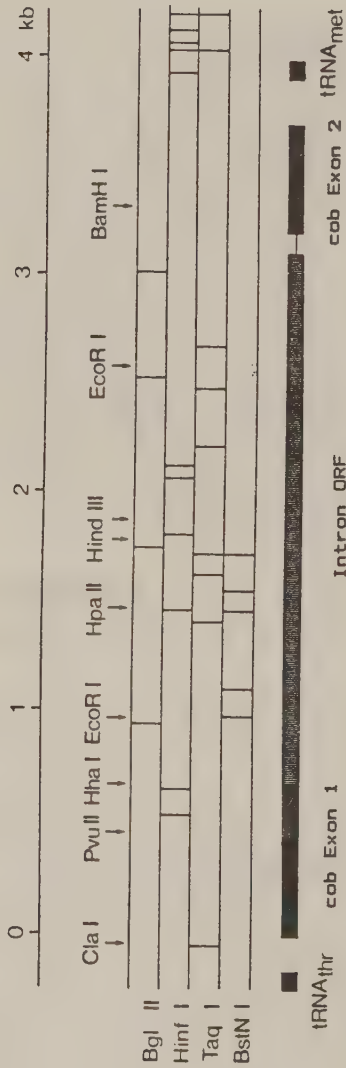


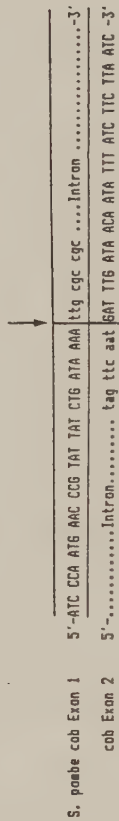
Abb. 2: Feinstrukturkarte des *cob*-Gens von *S. pombe*.

Die Restriktionsschnittstellen, die in der Karte eingezeichnet sind, wurden durch die DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Exonbereiche sind mit ausgefüllten Balken gekennzeichnet, der Intronleserahmen ist schraffiert dargestellt.

1.3 Die Lage des S. pombe cob-Introns im Vergleich zu den cob-Introns anderer Pilze.

Die DNA-Sequenz in den Regionen, welche das Intron flankieren, wurde mit den entsprechenden cob-Sequenzen anderer Organismen verglichen. Die bevorzugten Exon/Intron-Grenzen sind in den Abbildungen 4 und 5 durch Pfeile markiert. Diese Festsetzung wird durch maximale Aminosäurehomologie und durch Einbeziehung zweier invarianter Aminosäuren (Lysin und Asparagin, Abb.4) erreicht. Ebenso wird dadurch ein Alignment der Exonsequenzen mit dem intronlosen cob-Gen des S. pombe-Stammes EF1 (Triinkl et al., 1985) ermöglicht. Das S. pombe cob-Intron beginnt daher an einer Position entsprechend 228 Aminosäuren vom N-terminalen Ende entfernt. Cob-Introns anderer Organismen sind bisher an dieser Position noch nicht gefunden worden. Introns kommen hauptsächlich in hochkonservierten Bereichen von Genen vor (Lang 1984), was für die meisten cob-Introns zutrifft (Abb.5). Das cob-Intron von S. pombe hingegen liegt in einem weniger stark konservierten Bereich, jedoch an einer Stelle, die von zwei invarianten Aminosäuren flankiert wird, wie bereits erwähnt wurde. Introns in Kerngenen kommen auch häufig an Positionen vor, welche Grenzen zwischen funktionellen Domänen von Proteinen entsprechen (Go, 1981). Bei Vergleich der Positionen des cob-Introns mit den neun Transmembran-Domänen (siehe unten) kann jedoch kein klar definiertes Muster erkannt werden.

Abb. 4: Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen im cob-Gen von *S. pombe*



Stamm 50	cob-Protein	: I P M N P Y Y L I K D L I T I F I F L I
Stamm EFI	"	: I P M S P Y Y L I K D L I T I F I F L I
N. crassa	"	: I T F A P Y Y L F K D L I T I F I F I Y
A. nidulans	"	: L P F A P Y F I F K D L I T I F I F I F I
S. cerevisiae	"	: I P M H S Y F I F K D L V T V F L F M L
Z. mays	"	: I A S Y P Y F Y V K D L V G M V A S A L
H. sapiens	"	: I T F H P Y Y T I K D A L G L L F L L

Anzahl identischer : 6 4 3 1 6 7 4 3 3 7 7 6 4 5 4 5 4 6 3 3

Aminosäuren mit

S. pombe Stamm 50

Abb. 4:

Die Festsetzung der Exon/Intron-Grenzen erfolgte durch Alignment maximaler Aminosäurehomologie mit den Sequenzen von Organismen, die in diesem Bereich durchgehende *cob*-Gene besitzen. Basierend auf diesem Alignment wurde ein Spleißpunkt zwischen den 2 invarianten Lysin-(AAA) und Asparaginsäure-Codons (GAT) festgesetzt. Dies wurde nachträglich durch Primerextension-Versuche von S. Distler (unveröffentlichte Daten) bestätigt. Die aufgeführten Sequenzdaten wurden entnommen aus: *N. crassa*, Burke et al. (1984), Helmer-Citterich et al. (1983); *A. nidulans*, Waring et al. (1983); *S. cerevisiae*, Nobrega & Tzagoloff (1980); *Z. mays*, Dawson et al. (1984); *H. sapiens*, Anderson et al. (1982).

Abb. 5: Aminosäurehomologien in Cytochrom b-Genen

In Abbildung 5 sind die Aminosäurehomologien abgeleiteter Apocytochrom b-Sequenzen verschiedener Organismen gezeigt. Die Zuordnung der verschiedenen cob-Sequenzen wurde durch einzelne Aminosäuredeletionen (-) optimiert. Die Insertionsstellen von Introns sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Unterscheidung von Blöcken konservierter Abschnitte wurden diejenigen Positionen, die in mindestens 5 Organismen identisch sind mit Punkten, bzw. die in mindestens 8 identisch sind mit Doppelpunkten gekennzeichnet. Durchgehende Abschnitte mit mehr als 5 Punkten sind umrahmt. Die umrahmten Abschnitte schließen außerdem benachbarte Regionen mit Aminosäurehomologien über 60% ein. Die vermutlich membrandurchspannenden Strecken (Kyte & Doolittle, 1982) sind durch römische Zahlen und einer Folge von Sternen (*) gekennzeichnet. Häm-Bindungsstellen wurden nach Widger et al. (1984) und Saraste (1984) angenommen. Bei Bestimmung der lokalen Proteinsekundärstruktur nach Garnier (1978) lassen sich im *S. pombe* cob-Protein vier Konformationen unterscheiden:

- H= alpha-helikal;
- E= ausgedehnte beta-Faltblattstruktur;
- T= alpha-turn;
- C= ungeordnete Konfiguration.

1.4 Aus der DNA-Sequenz abgeleitete Struktur des Cytochrom b-Polypeptids und Vergleich mit homologen Proteinen.

Das von der DNA-Sequenz abgeleitete Polypeptid besteht aus 387 Aminosäuren. Ein Vergleich mit Cytochrom b-Sequenzen von *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *A. nidulans*, *Z. mays*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, Spinat-Chloroplasten und *Trypanosoma brucei* zeigt zwischen 21,4% bis 56,5% identische Aminosäuren (Tab.2). Die entsprechenden Werte für das *cox1*-Gen betragen 37% bis 55% (B.F. Lang, unveröffentlichte Daten, B.F. Lang 1984) und für die Untereinheit 6 der ATPase 24% bis 39% (Lang et al., 1983). Durch diese Analyse mitochondrialer Gene ist *S. pombe* evolutionär ziemlich weit von anderen Pilzen gestellt und stimmt mit den phylogenetischen Stammbäumen, die auf der Analyse von 5s-rRNA-Sequenzen basieren, überein (Huysmans et al., 1983; siehe Abb.6). Interessant ist die Tatsache, daß die evolutionäre Distanz zwischen den mitochondrialen *cob*-Genen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* (55,8%) dem Verwandtschaftsgrad von Kerngenen beider Organismen mit 51% für Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und 69% für Cytochrom c ziemlich ähnlich ist (Russell und Hall, 1982, 1983). Dies deutet darauf hin, daß sich scheinbar die mitochondrialen Gene und die Kerngene mit ungefähr der gleichen Rate entwickelt haben müssen, eine Beobachtung, die zum erstenmal beim Vergleich von mitochondrialen und cytoplasmatischen tRNAs von *S. pombe* gemacht wurde (R.J. Cedergren, X. Sankoff und B.F. Lang, unveröffentlichte Daten).

Tab. 2: Aminosäurehomologien verschiedener cob-Gene in Prozent:

Organismus	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(1) <i>S. pombe</i>	55,8	56,5	55,8	47,5	47,7	48,5	25,6	21,4 %
(2) <i>A. nidulans</i>		80,2	59,3	50,3	50,0	52,8	26,1	22,1 %
(3) <i>N. crassa</i>			57,8	49,7	50,3	51,3	25,6	21,9 %
(4) <i>S. cerevisiae</i>				48,0	47,0	46,7	23,9	21,4 %
(5) <i>Z. mays</i>					47,2	50,0	26,6	22,1 %
(6) <i>H. sapiens</i>						74,4	23,9	21,4 %
(7) <i>M. musculus</i>							24,6	21,1 %
(8) Spinat Chloroplasten								14,8 %
(9) Trypanosoma brucei								

Die Werte wurden aus dem Alignment in Abbildung 5 errechnet.

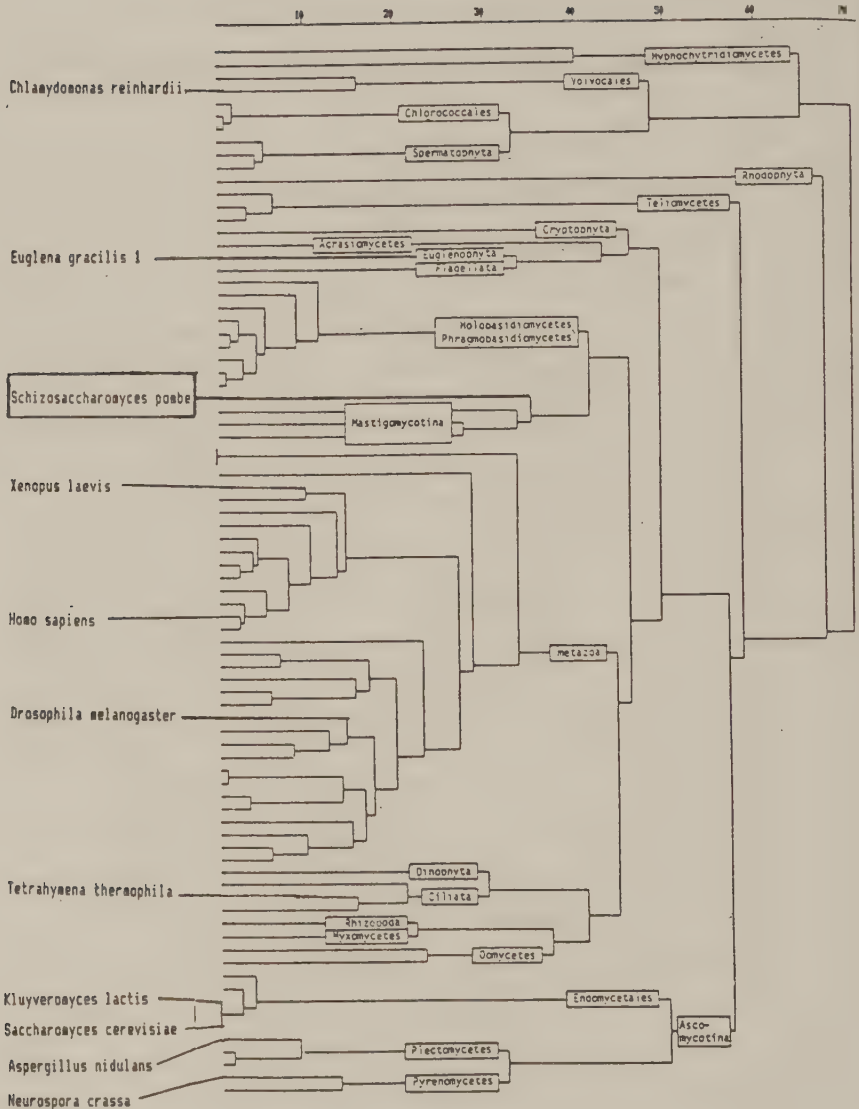


Abb. 6:

Phylogenetischer Stammbaum aufgrund von 5S-rRNA-Sequenzen.-
Daten entnommen aus Huysmans et al. (1983). Aus Übersichts-
gründen sind zur Orientierung nur einzelne Organismen aufge-
führt.

Dies steht im Gegensatz zu der Situation, die bei Tieren beobachtet wurde, wo die Fixation mitochondrialer Mutationen um den Faktor 10 schneller abläuft als bei Kern-DNA (Brown et al., 1979).

Ein vorläufiges Modell für die strukturelle Organisation des Cytochrom b in der inneren Mitochondrienmembran wurde von Widger et al. (1984) und Saraste et al. (1984) vorgeschlagen. Durch Bestimmung der Hydrophobizitätswerte nach Kyte und Doolittle (1982) bei den cob-Genen verschiedener Organismen konnten neun Membran-durchdringende Domänen gefunden werden (Segmente I bis IX). Die Segmente I und V enthalten Paare von invarianten Histidin-Resten, wobei jedes Paar durch 13 Aminosäurereste voneinander getrennt wird, die vermutlich die Häm-Bindungsstelle darstellen. Ein ähnliches Hydrophobizitätsmuster kann auch bei *S. pombe* gefunden werden. Durch Bestimmung der lokalen Sekundärstruktur des abgeleiteten cob-Proteins nach Garnier (1978), konnten neun Domänen bestimmt werden (Abb.5), von denen nur Domäne V ausgesprochene alpha-helikale Struktur aufweist. Diese Analyse zeigt, daß für die meisten Membran-durchdringenden Regionen gemischte Konformationen vorausgesagt werden können, die hauptsächlich aus beta-Faltblattstrukturen mit einigen alpha-turns bestehen und in diesen verschiedenen Formen nur 15 Reste benötigt werden, um die Membran zu durchdringen. Bisher wurde allgemein angenommen, daß hydrophobe Proteinbereiche in ausschließlich alpha-helikaler Konfiguration in Membranen integriert sind. (Widger et al., 1984; Saraste, 1984).

1.5 Die RNA-Sekundärstruktur des cob-Introns von

S. pombe

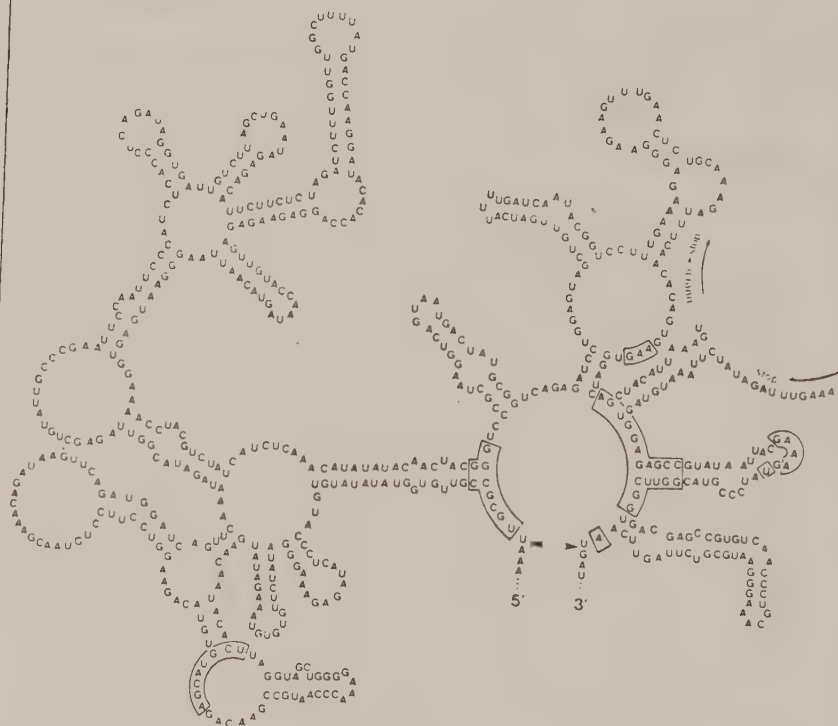
Die ersten 656 Nukleotide der 5'-Region und 98 Nukleotide der untranslatierten 3'-Region des cob-Introns lassen sich in eine Sekundärstruktur falten (Abb.7a), die fast genau mit den für die Gruppe II-Introns von *S. cerevisiae* aI1 und aI2 (Abb.7b) (Michel et al., 1982) sowie dem ersten Intron von *cox1* in *P. anserina* (pI-cox1) (Osiewicz und Esser, 1984; Abb.7c) vorgeschlagenen Strukturen übereinstimmt. Obwohl auf Nukleotidebene im Vergleich zu anderen Gruppe II-Introns nur eine geringe Homologie besteht, ist im Gegensatz dazu die RNA-Sekundärstruktur hoch konserviert. Die einzig auf Nukleotidebene konservierten Bereiche innerhalb der Kernstruktur sind in Abb.7a umrahmt. Sie stimmen mit schon früher von Michel et al. (1982) bestimmten Sequenzen überein. Zusätzlich läßt sich noch eine konservierte Sequenz von 8 Basenpaaren nahe dem 5'-Ende des cob-Introns finden. Sie beginnt bei Position 75, durchläuft eine helikale Region und endet bei Position 113 (Abb.7a und 8). Diese Consensus-Sequenz ist auch in dem Gruppe II-verwandten cob-Intron bI1 und dem *cox1*-Intron aI5 von *S. cerevisiae* vorhanden, jedoch an einer anderen Position; im Falle von bI1 zwischen Position 509 bis 512 und 645 bis 652 (nach dem Sekundärstrukturmodell nach Schmelzer et al. 1983). In aI5 beginnt diese Sequenz bei Position 654 (Bonitz et al., 1980).

Es besteht die Möglichkeit, daß diese Consensus-Sequenz in irgendeiner Weise etwas mit der Intronfaltung zu tun hat, die für das Spleißen notwendig ist, da eine zur Spleißdefizienz führende Mutation in *bl1* von *S. cerevisiae* an einer Position lokalisiert wurde, die nur 2 Basenpaare von dieser Consensus-Sequenz entfernt ist (Schmelzer et al., 1983).

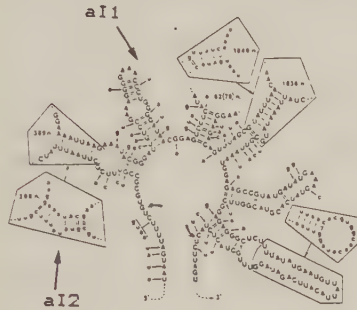
Innerhalb der 3'-untranslatierten Region bzw. den Regionen I, III oder V sind keine Sequenzen enthalten, die Komplementarität zu dieser Consensus-Sequenz zeigen (analog zu den R und S-Consensus-Sequenzen in den Gruppe I-Introns) (Michel & Dujon, 1982; Waring et al., 1982)). Zusätzlich zu der möglichen Sekundärstruktur der Intronsequenz lassen sich Bereiche der flankierenden Exons in Helices mit ungewöhnlich hoher energetischer Stabilität falten. Die drei helikalen Regionen enthalten eine repetitierte Sequenz, wie sie in Abbildung 9 dargestellt ist. Bisher konnten keine ähnlichen Strukturen oder direkt-repetitierten Sequenzen an analogen Positionen (außer in den Chloroplasten-tRNA-Genen) gefunden werden.

Ob solche Strukturen einen Zusammenhang mit dem Vorkommen von Introns haben, ist bisher noch nicht bewiesen worden. Interessant ist jedoch die Tatsache, daß sich in diesem Bereich des *cob*-Genes eine Anhäufung von Basenaustauschen beobachten läßt, wenn man das *cob*-Gen des Stammes 50 mit dem intronlosen *cob*-Gen des Stammes EF 1 vergleicht (Trinkl et al., 1985). Dieselbe Beobachtung wurde bei *S. cerevisiae* Stamm KL 14-4A für die Exons 5a und 5b und des Stammes D273-10B mit ungeteiltem Exon 5 im *cox1*-Gen gemacht (Hensgens et al., 1983).

Abb. 7a



(Abb. 7b)



(Abb. 7c)

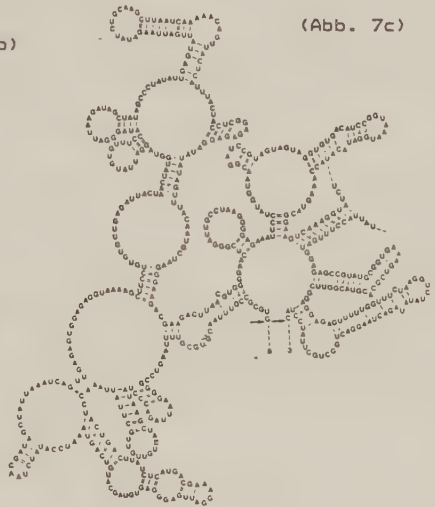


Abb. 7: RNA-Sekundärfaltstrukturen von Gruppe II-Introns

In Abb. 7a ist eine mögliche Sekundärstruktur des *S. pombe* cob-Introns in Anlehnung an das für Gruppe II-Introns von Michel et al. (1982) vorgeschlagene Modell dargestellt. Nukleotide in der Kernregion (Michel & Dujon, 1983) sind eingerahmt, wenn sie in allen 4 Introns, die ORFs enthalten, konserviert sind oder in drei Introns, wenn das vierte Nukleotid aus einem konservierten Purin oder Pyrimidin besteht. Die Spleißpunkte sind durch Pfeile eingezeichnet. Im Vergleich dazu sind die vorgeschlagenen Sekundärstrukturen für die Gruppe II-Introns aI1, aI2 im *cox 1*-Gen von *S. cerevisiae* (Abb. 7b) und die *Podospora anserina* pl-DNA dargestellt. (Abb. 7c)

Da diese Basenaustausche im Stamm D237-10B zu Codons führen, die sehr selten in der mt DNA dieser Hefe vorkommen, wird von Hensgens et al. angenommen, daß Rekombination mit fremder DNA als Ursache dafür in Frage kommen kann. Wenn solche Vorgänge sich vor noch nicht allzulanger Zeit ereignet haben, könnte es noch zu keinen Rückmutationen gekommen sein, die zu den normalerweise benutzten Codons führten. Für den Stamm EF 1, der 99,1% zum Stamm 50 in den Exonbereichen homolog ist (Trinkl et al. 1985) ist es daher nicht zu entscheiden, ob dieser Stamm jemals ein cob-Intron besessen, oder es verloren hat (Trinkl et al. 1985).

Abb. 8: Neue Consensus-Sequenz in Gruppe II-Introns

			:	:
			:	:
Consensus-Sequenz:		A G C A U G = C U		
		A		
S. pombe	cob	A C A G A G C A U G = C U U U A		
S. cerevisiae	a11	C A A U A G C A U G = C U A A C	Gruppe II-Introns	
S. cerevisiae	a12	C A A U A G C A U G = C U U A C	mit ORFs	
P. anserina	cox1	G U G U A G C A U G = C U U A U		
Z. mays	cox2	C U A U A G C A U G = C U U A C	Gruppe II-Introns	
Z. mays	tRNA ^{ile}	C A U U A G C A U G = C U G A C	ohne ORFs	
Z. mays	tRNA ^{ala}	A C U G A A C A U G = C U C A C		
S. cerevisiae	b11	U G A A A G C A U G = C U A A A	Gruppe II-verwandte	
S. cerevisiae	a15	U G A A A A U C U G = C U A A A	Introns	

In Abb. 8 ist eine neue Consensus-Sequenz von Gruppe II-Introns dargestellt. Die Sequenz im 5'-terminalen Abschnitt des S. pombe cob-Introns (Positionen 104 bis 113, sowie 75 bis 79) ist mit denen anderer Gruppe II-Introns verglichen. Der konservierte Bereich überspannt ein helikales Segment (Position ist durch = markiert). Eine ähnliche Sequenz ist auch in den S. cerevisiae Gruppe II-Introns a15 und b11 vorhanden, jedoch an einer anderen Position.



Abb. 9:

Mögliche RNA-Sekundärstruktur in den Exon-Sequenzen, die an das cob-Intron grenzen. Die repetierte Sequenz ist durch Linien gekennzeichnet bzw. in den gepaarten Bereichen schattiert. Einzelne Abweichungen von der Consensus-Sequenz wurden erlaubt, sowie Austausche von A und T in den gepaarten Bereichen. Die Spleißpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet.

1.6 Aminosäuresequenzvergleich des cob-Intron-Leserahmens mit anderen Intron-ORFs

Der ORF im cob-Intron von *S. pombe*, der in Phase mit dem Leserahmen des ersten Exons ist, besitzt wie auch ORFs in mitochondrialen Mosaikgenen anderer Pilze die Codierungskapazität für ein Polypeptid, das reich an basischen und polaren Resten ist (Bonitz et al., 1980; Nobrega & Tzagoloff, 1980). Beim Vergleich der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Intron-ORFs der ersten zwei Introns (aI1 und aI2) im *cox1*-Gen von *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980) und der pl-DNA im *cox1*-Gen von *P. anserina* (Osiewacz & Esser, 1984) können einige homologe Abschnitte beobachtet werden (Abb.10 und 11). Das Alignment, das in Abb.10 dargestellt ist, läßt ein Maximum an identischen oder konservativ substituierten Aminosäuren zu und bedarf relativ weniger Insertionen oder Deletionen über den gesamten, aus 807 Aminosäureresten bestehenden Bereich. Drei Abschnitte (Region II, IV und VI), welche mehr als 50% der codierenden Sequenz überspannen, zeigen die höchste Aminosäure-Identität (45%, 38% und 53%) wenn das cob-Intron von *S. pombe* mit Intron aI1 von *S. cerevisiae* verglichen wird. Wenn dabei konservative Aminosäuresubstitutionen in den Proteinsequenzvergleich mit einbezogen werden, steigt die Homologie sogar bis auf 69%, 59% und 71 % an. Diese Verwandtschaft spiegelt sich auf Nukleotidebene mit Werten von 57%, 54% und 58% wider.

5. pombe cob
5. cerevisiae 011
5. cerevisiae 012
Pansermia pl-1291

LRGCIYVYPIH-----RENDIL--CVKINTIILGSGM¹YPRNPK²OVOKLEVETKOIS³RGVSQIDITY⁴YVIALEFOPSPHQIDGCLSMIELEFF
CARTSAVISLAR-----TALVATILN⁵KIPIVNSCVA⁶ETGVYCIKRTYH⁷-----BYGVCVCYVNA⁸ITNLQVIRIT⁹-ISSYIU¹⁰--DYWK
GAFERLIYVCE¹¹.23.LAVATYVYVPIH¹²YVAPGNA¹³ISTOTVCIKRSAGV¹⁴-----KOPQAGNCNCA¹⁵PNNSKE¹⁶-CIAP¹⁷-SLTPSH¹⁸-1GIV
GALFVNRKSGE¹⁹.5.YCCGCLLILL²⁰-----HNGGLNCSMSVNPBYLTIAIK²¹-----EVESEOVKASCVLRLTLHVGLCV²²-SIGIKI²³-----AIAL

SHS²⁴NYGYDQVGTPEESQ²⁵PIKILKNGSKPTSLISNYITTT²⁶PAKUS²⁷YVYV²⁸-RDPQVAVDIF²⁹DOYIG³⁰MEGCSLNSAK³¹ISTONSSATLKSSNNS³².31.LNK³³IDLKRSKNYPNIVID
QVME³⁴YVEYERLME³⁵IVDSH³⁶IVKRRKOTNRK³⁷-----ONKRS³⁸LEFE³⁹IT⁴⁰DOV⁴¹-RQVYVETQWR⁴²-ARR⁴³IQVQVYVSVNRNLTAKRQKIDINI⁴⁴ELSKDTS⁴⁵-----TSIL⁴⁶IEFKELVMOHNEEM
HVAIVLEEVHETLNESTALIKSMILEGCS⁴⁷-----NGKLRN⁴⁸ISE⁴⁹NI⁵⁰YKNGFOPKRNK⁵¹-RRT⁵²SLSLNARKEDSLAVYTKRINTDSE⁵³-----LND⁵⁴HEHNMUNT⁵⁵-----ETI
YVW⁵⁶KISASLTKNSYSP⁵⁷LENGCIYV⁵⁸-----NAGNANILN⁵⁹EL⁶⁰EP⁶¹-KGRNSYONGSVAVGTSGKWIITKVKRSKSPSEAKRQCSL⁶²-----GEN⁶³YVYNER⁶⁴-----QQ

Region II

RLNYKDELINRI⁶⁵ELI⁶⁶AVYKIK⁶⁷SPQ⁶⁸NT⁶⁹IK⁷⁰KPT⁷¹LD⁷²ISIDV⁷³PI⁷⁴IOS⁷⁵KSE⁷⁶PI⁷⁷PI⁷⁸PI⁷⁹PI⁸⁰PI⁸¹PI⁸²PI⁸³PI⁸⁴PI⁸⁵PI⁸⁶PI⁸⁷PI⁸⁸PI⁸⁹PI⁹⁰PI⁹¹PI⁹²PI⁹³PI⁹⁴PI⁹⁵PI⁹⁶PI⁹⁷PI⁹⁸PI⁹⁹PI¹⁰⁰PI¹⁰¹PI¹⁰²PI¹⁰³PI¹⁰⁴PI¹⁰⁵PI¹⁰⁶PI¹⁰⁷PI¹⁰⁸PI¹⁰⁹PI¹¹⁰PI¹¹¹PI¹¹²PI¹¹³PI¹¹⁴PI¹¹⁵PI¹¹⁶PI¹¹⁷PI¹¹⁸PI¹¹⁹PI¹²⁰PI¹²¹PI¹²²PI¹²³PI¹²⁴PI¹²⁵PI¹²⁶PI¹²⁷PI¹²⁸PI¹²⁹PI¹³⁰PI¹³¹PI¹³²PI¹³³PI¹³⁴PI¹³⁵PI¹³⁶PI¹³⁷PI¹³⁸PI¹³⁹PI¹⁴⁰PI¹⁴¹PI¹⁴²PI¹⁴³PI¹⁴⁴PI¹⁴⁵PI¹⁴⁶PI¹⁴⁷PI¹⁴⁸PI¹⁴⁹PI¹⁵⁰PI¹⁵¹PI¹⁵²PI¹⁵³PI¹⁵⁴PI¹⁵⁵PI¹⁵⁶PI¹⁵⁷PI¹⁵⁸PI¹⁵⁹PI¹⁶⁰PI¹⁶¹PI¹⁶²PI¹⁶³PI¹⁶⁴PI¹⁶⁵PI¹⁶⁶PI¹⁶⁷PI¹⁶⁸PI¹⁶⁹PI¹⁷⁰PI¹⁷¹PI¹⁷²PI¹⁷³PI¹⁷⁴PI¹⁷⁵PI¹⁷⁶PI¹⁷⁷PI¹⁷⁸PI¹⁷⁹PI¹⁸⁰PI¹⁸¹PI¹⁸²PI¹⁸³PI¹⁸⁴PI¹⁸⁵PI¹⁸⁶PI¹⁸⁷PI¹⁸⁸PI¹⁸⁹PI¹⁹⁰PI¹⁹¹PI¹⁹²PI¹⁹³PI¹⁹⁴PI¹⁹⁵PI¹⁹⁶PI¹⁹⁷PI¹⁹⁸PI¹⁹⁹PI²⁰⁰PI²⁰¹PI²⁰²PI²⁰³PI²⁰⁴PI²⁰⁵PI²⁰⁶PI²⁰⁷PI²⁰⁸PI²⁰⁹PI²¹⁰PI²¹¹PI²¹²PI²¹³PI²¹⁴PI²¹⁵PI²¹⁶PI²¹⁷PI²¹⁸PI²¹⁹PI²²⁰PI²²¹PI²²²PI²²³PI²²⁴PI²²⁵PI²²⁶PI²²⁷PI²²⁸PI²²⁹PI²³⁰PI²³¹PI²³²PI²³³PI²³⁴PI²³⁵PI²³⁶PI²³⁷PI²³⁸PI²³⁹PI²⁴⁰PI²⁴¹PI²⁴²PI²⁴³PI²⁴⁴PI²⁴⁵PI²⁴⁶PI²⁴⁷PI²⁴⁸PI²⁴⁹PI²⁵⁰PI²⁵¹PI²⁵²PI²⁵³PI²⁵⁴PI²⁵⁵PI²⁵⁶PI²⁵⁷PI²⁵⁸PI²⁵⁹PI²⁶⁰PI²⁶¹PI²⁶²PI²⁶³PI²⁶⁴PI²⁶⁵PI²⁶⁶PI²⁶⁷PI²⁶⁸PI²⁶⁹PI²⁷⁰PI²⁷¹PI²⁷²PI²⁷³PI²⁷⁴PI²⁷⁵PI²⁷⁶PI²⁷⁷PI²⁷⁸PI²⁷⁹PI²⁸⁰PI²⁸¹PI²⁸²PI²⁸³PI²⁸⁴PI²⁸⁵PI²⁸⁶PI²⁸⁷PI²⁸⁸PI²⁸⁹PI²⁹⁰PI²⁹¹PI²⁹²PI²⁹³PI²⁹⁴PI²⁹⁵PI²⁹⁶PI²⁹⁷PI²⁹⁸PI²⁹⁹PI³⁰⁰PI³⁰¹PI³⁰²PI³⁰³PI³⁰⁴PI³⁰⁵PI³⁰⁶PI³⁰⁷PI³⁰⁸PI³⁰⁹PI³¹⁰PI³¹¹PI³¹²PI³¹³PI³¹⁴PI³¹⁵PI³¹⁶PI³¹⁷PI³¹⁸PI³¹⁹PI³²⁰PI³²¹PI³²²PI³²³PI³²⁴PI³²⁵PI³²⁶PI³²⁷PI³²⁸PI³²⁹PI³³⁰PI³³¹PI³³²PI³³³PI³³⁴PI³³⁵PI³³⁶PI³³⁷PI³³⁸PI³³⁹PI³⁴⁰PI³⁴¹PI³⁴²PI³⁴³PI³⁴⁴PI³⁴⁵PI³⁴⁶PI³⁴⁷PI³⁴⁸PI³⁴⁹PI³⁵⁰PI³⁵¹PI³⁵²PI³⁵³PI³⁵⁴PI³⁵⁵PI³⁵⁶PI³⁵⁷PI³⁵⁸PI³⁵⁹PI³⁶⁰PI³⁶¹PI³⁶²PI³⁶³PI³⁶⁴PI³⁶⁵PI³⁶⁶PI³⁶⁷PI³⁶⁸PI³⁶⁹PI³⁷⁰PI³⁷¹PI³⁷²PI³⁷³PI³⁷⁴PI³⁷⁵PI³⁷⁶PI³⁷⁷PI³⁷⁸PI³⁷⁹PI³⁸⁰PI³⁸¹PI³⁸²PI³⁸³PI³⁸⁴PI³⁸⁵PI³⁸⁶PI³⁸⁷PI³⁸⁸PI³⁸⁹PI³⁹⁰PI³⁹¹PI³⁹²PI³⁹³PI³⁹⁴PI³⁹⁵PI³⁹⁶PI³⁹⁷PI³⁹⁸PI³⁹⁹PI⁴⁰⁰PI⁴⁰¹PI⁴⁰²PI⁴⁰³PI⁴⁰⁴PI⁴⁰⁵PI⁴⁰⁶PI⁴⁰⁷PI⁴⁰⁸PI⁴⁰⁹PI⁴¹⁰PI⁴¹¹PI⁴¹²PI⁴¹³PI⁴¹⁴PI⁴¹⁵PI⁴¹⁶PI⁴¹⁷PI⁴¹⁸PI⁴¹⁹PI⁴²⁰PI⁴²¹PI⁴²²PI⁴²³PI⁴²⁴PI⁴²⁵PI⁴²⁶PI⁴²⁷PI⁴²⁸PI⁴²⁹PI⁴³⁰PI⁴³¹PI⁴³²PI⁴³³PI⁴³⁴PI⁴³⁵PI⁴³⁶PI⁴³⁷PI⁴³⁸PI⁴³⁹PI⁴⁴⁰PI⁴⁴¹PI⁴⁴²PI⁴⁴³PI⁴⁴⁴PI⁴⁴⁵PI⁴⁴⁶PI⁴⁴⁷PI⁴⁴⁸PI⁴⁴⁹PI⁴⁵⁰PI⁴⁵¹PI⁴⁵²PI⁴⁵³PI⁴⁵⁴PI⁴⁵⁵PI⁴⁵⁶PI⁴⁵⁷PI⁴⁵⁸PI⁴⁵⁹PI⁴⁶⁰PI⁴⁶¹PI⁴⁶²PI⁴⁶³PI⁴⁶⁴PI⁴⁶⁵PI⁴⁶⁶PI⁴⁶⁷PI⁴⁶⁸PI⁴⁶⁹PI⁴⁷⁰PI⁴⁷¹PI⁴⁷²PI⁴⁷³PI⁴⁷⁴PI⁴⁷⁵PI⁴⁷⁶PI⁴⁷⁷PI⁴⁷⁸PI⁴⁷⁹PI⁴⁸⁰PI⁴⁸¹PI⁴⁸²PI⁴⁸³PI⁴⁸⁴PI⁴⁸⁵PI⁴⁸⁶PI⁴⁸⁷PI⁴⁸⁸PI⁴⁸⁹PI⁴⁹⁰PI⁴⁹¹PI⁴⁹²PI⁴⁹³PI⁴⁹⁴PI⁴⁹⁵PI⁴⁹⁶PI⁴⁹⁷PI⁴⁹⁸PI⁴⁹⁹PI⁵⁰⁰PI⁵⁰¹PI⁵⁰²PI⁵⁰³PI⁵⁰⁴PI⁵⁰⁵PI⁵⁰⁶PI⁵⁰⁷PI⁵⁰⁸PI⁵⁰⁹PI⁵¹⁰PI⁵¹¹PI⁵¹²PI⁵¹³PI⁵¹⁴PI⁵¹⁵PI⁵¹⁶PI⁵¹⁷PI⁵¹⁸PI⁵¹⁹PI⁵²⁰PI⁵²¹PI⁵²²PI⁵²³PI⁵²⁴PI⁵²⁵PI⁵²⁶PI⁵²⁷PI⁵²⁸PI⁵²⁹PI⁵³⁰PI⁵³¹PI⁵³²PI⁵³³PI⁵³⁴PI⁵³⁵PI⁵³⁶PI⁵³⁷PI⁵³⁸PI⁵³⁹PI⁵⁴⁰PI⁵⁴¹PI⁵⁴²PI⁵⁴³PI⁵⁴⁴PI⁵⁴⁵PI⁵⁴⁶PI⁵⁴⁷PI⁵⁴⁸PI⁵⁴⁹PI⁵⁵⁰PI⁵⁵¹PI⁵⁵²PI⁵⁵³PI⁵⁵⁴PI⁵⁵⁵PI⁵⁵⁶PI⁵⁵⁷PI⁵⁵⁸PI⁵⁵⁹PI⁵⁶⁰PI⁵⁶¹PI⁵⁶²PI⁵⁶³PI⁵⁶⁴PI⁵⁶⁵PI⁵⁶⁶PI⁵⁶⁷PI⁵⁶⁸PI⁵⁶⁹PI⁵⁷⁰PI⁵⁷¹PI⁵⁷²PI⁵⁷³PI⁵⁷⁴PI⁵⁷⁵PI⁵⁷⁶PI⁵⁷⁷PI⁵⁷⁸PI⁵⁷⁹PI⁵⁸⁰PI⁵⁸¹PI⁵⁸²PI⁵⁸³PI⁵⁸⁴PI⁵⁸⁵PI⁵⁸⁶PI⁵⁸⁷PI⁵⁸⁸PI⁵⁸⁹PI⁵⁹⁰PI⁵⁹¹PI⁵⁹²PI⁵⁹³PI⁵⁹⁴PI⁵⁹⁵PI⁵⁹⁶PI⁵⁹⁷PI⁵⁹⁸PI⁵⁹⁹PI⁶⁰⁰PI⁶⁰¹PI⁶⁰²PI⁶⁰³PI⁶⁰⁴PI⁶⁰⁵PI⁶⁰⁶PI⁶⁰⁷PI⁶⁰⁸PI⁶⁰⁹PI⁶¹⁰PI⁶¹¹PI⁶¹²PI⁶¹³PI⁶¹⁴PI⁶¹⁵PI⁶¹⁶PI⁶¹⁷PI⁶¹⁸PI⁶¹⁹PI⁶²⁰PI⁶²¹PI⁶²²PI⁶²³PI⁶²⁴PI⁶²⁵PI⁶²⁶PI⁶²⁷PI⁶²⁸PI⁶²⁹PI⁶³⁰PI⁶³¹PI⁶³²PI⁶³³PI⁶³⁴PI⁶³⁵PI⁶³⁶PI⁶³⁷PI⁶³⁸PI⁶³⁹PI⁶⁴⁰PI⁶⁴¹PI⁶⁴²PI⁶⁴³PI⁶⁴⁴PI⁶⁴⁵PI⁶⁴⁶PI⁶⁴⁷PI⁶⁴⁸PI⁶⁴⁹PI⁶⁵⁰PI⁶⁵¹PI⁶⁵²PI⁶⁵³PI⁶⁵⁴PI⁶⁵⁵PI⁶⁵⁶PI⁶⁵⁷PI⁶⁵⁸PI⁶⁵⁹PI⁶⁶⁰PI⁶⁶¹PI⁶⁶²PI⁶⁶³PI⁶⁶⁴PI⁶⁶⁵PI⁶⁶⁶PI⁶⁶⁷PI⁶⁶⁸PI⁶⁶⁹PI⁶⁷⁰PI⁶⁷¹PI⁶⁷²PI⁶⁷³PI⁶⁷⁴PI⁶⁷⁵PI⁶⁷⁶PI⁶⁷⁷PI⁶⁷⁸PI⁶⁷⁹PI⁶⁸⁰PI⁶⁸¹PI⁶⁸²PI⁶⁸³PI⁶⁸⁴PI⁶⁸⁵PI⁶⁸⁶PI⁶⁸⁷PI⁶⁸⁸PI⁶⁸⁹PI⁶⁹⁰PI⁶⁹¹PI⁶⁹²PI⁶⁹³PI⁶⁹⁴PI⁶⁹⁵PI⁶⁹⁶PI⁶⁹⁷PI⁶⁹⁸PI⁶⁹⁹PI⁷⁰⁰PI⁷⁰¹PI⁷⁰²PI⁷⁰³PI⁷⁰⁴PI⁷⁰⁵PI⁷⁰⁶PI⁷⁰⁷PI⁷⁰⁸PI⁷⁰⁹PI⁷¹⁰PI⁷¹¹PI⁷¹²PI⁷¹³PI⁷¹⁴PI⁷¹⁵PI⁷¹⁶PI⁷¹⁷PI⁷¹⁸PI⁷¹⁹PI⁷²⁰PI⁷²¹PI⁷²²PI⁷²³PI⁷²⁴PI⁷²⁵PI⁷²⁶PI⁷²⁷PI⁷²⁸PI⁷²⁹PI⁷³⁰PI⁷³¹PI⁷³²PI⁷³³PI⁷³⁴PI⁷³⁵PI⁷³⁶PI⁷³⁷PI⁷³⁸PI⁷³⁹PI⁷⁴⁰PI⁷⁴¹PI⁷⁴²PI⁷⁴³PI⁷⁴⁴PI⁷⁴⁵PI⁷⁴⁶PI⁷⁴⁷PI⁷⁴⁸PI⁷⁴⁹PI⁷⁵⁰PI⁷⁵¹PI⁷⁵²PI⁷⁵³PI⁷⁵⁴PI⁷⁵⁵PI⁷⁵⁶PI⁷⁵⁷PI⁷⁵⁸PI⁷⁵⁹PI⁷⁶⁰PI⁷⁶¹PI⁷⁶²PI⁷⁶³PI⁷⁶⁴PI⁷⁶⁵PI⁷⁶⁶PI⁷⁶⁷PI⁷⁶⁸PI⁷⁶⁹PI⁷⁷⁰PI⁷⁷¹PI⁷⁷²PI⁷⁷³PI⁷⁷⁴PI⁷⁷⁵PI⁷⁷⁶PI⁷⁷⁷PI⁷⁷⁸PI⁷⁷⁹PI⁷⁸⁰PI⁷⁸¹PI⁷⁸²PI⁷⁸³PI⁷⁸⁴PI⁷⁸⁵PI⁷⁸⁶PI⁷⁸⁷PI⁷⁸⁸PI⁷⁸⁹PI⁷⁹⁰PI⁷⁹¹PI⁷⁹²PI⁷⁹³PI⁷⁹⁴PI⁷⁹⁵PI⁷⁹⁶PI⁷⁹⁷PI⁷⁹⁸PI⁷⁹⁹PI⁸⁰⁰PI⁸⁰¹PI⁸⁰²PI⁸⁰³PI⁸⁰⁴PI⁸⁰⁵PI⁸⁰⁶PI⁸⁰⁷PI⁸⁰⁸PI⁸⁰⁹PI⁸¹⁰PI⁸¹¹PI⁸¹²PI⁸¹³PI⁸¹⁴PI⁸¹⁵PI⁸¹⁶PI⁸¹⁷PI⁸¹⁸PI⁸¹⁹PI⁸²⁰PI⁸²¹PI⁸²²PI⁸²³PI⁸²⁴PI⁸²⁵PI⁸²⁶PI⁸²⁷PI⁸²⁸PI⁸²⁹PI⁸³⁰PI⁸³¹PI⁸³²PI⁸³³PI⁸³⁴PI⁸³⁵PI⁸³⁶PI⁸³⁷PI⁸³⁸PI⁸³⁹PI⁸⁴⁰PI⁸⁴¹PI⁸⁴²PI⁸⁴³PI⁸⁴⁴PI⁸⁴⁵PI⁸⁴⁶PI⁸⁴⁷PI⁸⁴⁸PI⁸⁴⁹PI⁸⁵⁰PI⁸⁵¹PI⁸⁵²PI⁸⁵³PI⁸⁵⁴PI⁸⁵⁵PI⁸⁵⁶PI⁸⁵⁷PI⁸⁵⁸PI⁸⁵⁹PI⁸⁶⁰PI⁸⁶¹PI⁸⁶²PI⁸⁶³PI⁸⁶⁴PI⁸⁶⁵PI⁸⁶⁶PI⁸⁶⁷PI⁸⁶⁸PI⁸⁶⁹PI⁸⁷⁰PI⁸⁷¹PI⁸⁷²PI⁸⁷³PI⁸⁷⁴PI⁸⁷⁵PI⁸⁷⁶PI⁸⁷⁷PI⁸⁷⁸PI⁸⁷⁹PI⁸⁸⁰PI⁸⁸¹PI⁸⁸²PI⁸⁸³PI⁸⁸⁴PI⁸⁸⁵PI⁸⁸⁶PI⁸⁸⁷PI⁸⁸⁸PI⁸⁸⁹PI⁸⁹⁰PI⁸⁹¹PI⁸⁹²PI⁸⁹³PI⁸⁹⁴PI⁸⁹⁵PI⁸⁹⁶PI⁸⁹⁷PI⁸⁹⁸PI⁸⁹⁹PI⁹⁰⁰PI⁹⁰¹PI⁹⁰²PI⁹⁰³PI⁹⁰⁴PI⁹⁰⁵PI⁹⁰⁶PI⁹⁰⁷PI⁹⁰⁸PI⁹⁰⁹PI⁹¹⁰PI⁹¹¹PI⁹¹²PI⁹¹³PI⁹¹⁴PI⁹¹⁵PI⁹¹⁶PI⁹¹⁷PI⁹¹⁸PI⁹¹⁹PI⁹²⁰PI⁹²¹PI⁹²²PI⁹²³PI⁹²⁴PI⁹²⁵PI⁹²⁶PI⁹²⁷PI⁹²⁸PI⁹²⁹PI⁹³⁰PI⁹³¹PI⁹³²PI⁹³³PI⁹³⁴PI⁹³⁵PI⁹³⁶PI⁹³⁷PI⁹³⁸PI⁹³⁹PI⁹⁴⁰PI⁹⁴¹PI⁹⁴²PI⁹⁴³PI⁹⁴⁴PI⁹⁴⁵PI⁹⁴⁶PI⁹⁴⁷PI⁹⁴⁸PI⁹⁴⁹PI⁹⁵⁰PI⁹⁵¹PI⁹⁵²PI⁹⁵³PI⁹⁵⁴PI⁹⁵⁵PI⁹⁵⁶PI⁹⁵⁷PI⁹⁵⁸PI⁹⁵⁹PI⁹⁶⁰PI⁹⁶¹PI⁹⁶²PI⁹⁶³PI⁹⁶⁴PI⁹⁶⁵PI⁹⁶⁶PI⁹⁶⁷PI⁹⁶⁸PI⁹⁶⁹PI⁹⁷⁰PI⁹⁷¹PI⁹⁷²PI⁹⁷³PI⁹⁷⁴PI⁹⁷⁵PI⁹⁷⁶PI⁹⁷⁷PI⁹⁷⁸PI⁹⁷⁹PI⁹⁸⁰PI⁹⁸¹PI⁹⁸²PI⁹⁸³PI⁹⁸⁴PI⁹⁸⁵PI⁹⁸⁶PI⁹⁸⁷PI⁹⁸⁸PI⁹⁸⁹PI⁹⁹⁰PI⁹⁹¹PI⁹⁹²PI⁹⁹³PI⁹⁹⁴PI⁹⁹⁵PI⁹⁹⁶PI⁹⁹⁷PI⁹⁹⁸PI⁹⁹⁹PI¹⁰⁰⁰PI¹⁰⁰¹PI¹⁰⁰²PI¹⁰⁰³PI¹⁰⁰⁴PI¹⁰⁰⁵PI¹⁰⁰⁶PI¹⁰⁰⁷PI¹⁰⁰⁸PI¹⁰⁰⁹PI¹⁰¹⁰PI¹⁰¹¹PI¹⁰¹²PI¹⁰¹³PI¹⁰¹⁴PI¹⁰¹⁵PI¹⁰¹⁶PI¹⁰¹⁷PI¹⁰¹⁸PI¹⁰¹⁹PI¹⁰²⁰PI¹⁰²¹PI¹⁰²²PI¹⁰²³PI¹⁰²⁴PI¹⁰²⁵PI¹⁰²⁶PI¹⁰²⁷PI¹⁰²⁸PI¹⁰²⁹PI¹⁰³⁰PI¹⁰³¹PI¹⁰³²PI¹⁰³³PI¹⁰³⁴PI¹⁰³⁵PI¹⁰³⁶PI¹⁰³⁷PI¹⁰³⁸PI¹⁰³⁹PI¹⁰⁴⁰PI¹⁰⁴¹PI¹⁰⁴²PI¹⁰⁴³PI¹⁰⁴⁴PI¹⁰⁴⁵PI¹⁰⁴⁶PI¹⁰⁴⁷PI¹⁰⁴⁸PI¹⁰⁴⁹PI¹⁰⁵⁰PI¹⁰⁵¹PI¹⁰⁵²PI¹⁰⁵³PI¹⁰⁵⁴PI¹⁰⁵⁵PI¹⁰⁵⁶PI¹⁰⁵⁷PI¹⁰⁵⁸PI¹⁰⁵⁹PI¹⁰⁶⁰PI¹⁰⁶¹PI¹⁰⁶²PI¹⁰⁶³PI¹⁰⁶⁴PI¹⁰⁶⁵PI¹⁰⁶⁶PI¹⁰⁶⁷PI¹⁰⁶⁸PI¹⁰⁶⁹PI¹⁰⁷⁰PI¹⁰⁷¹PI¹⁰⁷²PI¹⁰⁷³PI¹⁰⁷⁴PI¹⁰⁷⁵PI¹⁰⁷⁶PI¹⁰⁷⁷PI¹⁰⁷⁸PI¹⁰⁷⁹PI¹⁰⁸⁰PI¹⁰⁸¹PI¹⁰⁸²PI¹⁰⁸³PI¹⁰⁸⁴PI¹⁰⁸⁵PI¹⁰⁸⁶PI¹⁰⁸⁷PI¹⁰⁸⁸PI¹⁰⁸⁹PI¹⁰⁹⁰PI¹⁰⁹¹PI¹⁰⁹²PI¹⁰⁹³PI¹⁰⁹⁴PI¹⁰⁹⁵PI¹⁰⁹⁶PI¹⁰⁹⁷PI¹⁰⁹⁸PI¹⁰⁹⁹PI¹¹⁰⁰PI¹¹⁰¹PI¹¹⁰²PI¹¹⁰³PI¹¹⁰⁴PI¹¹⁰⁵PI¹¹⁰⁶PI¹¹⁰⁷PI¹¹⁰⁸PI¹¹⁰⁹PI¹¹¹⁰PI¹¹¹¹PI¹¹¹²PI¹¹¹³PI¹¹¹⁴PI¹¹¹⁵PI¹¹¹⁶PI¹¹¹⁷PI¹¹¹⁸PI¹¹¹⁹PI¹¹²⁰PI¹¹²¹PI¹¹²²PI¹¹²³PI¹¹²⁴PI¹¹²⁵PI¹¹²⁶PI¹¹²⁷PI¹¹²⁸PI¹¹²⁹PI¹¹³⁰PI¹¹³¹PI¹¹³²PI¹¹³³PI¹¹³⁴PI¹¹³⁵PI¹¹³⁶PI¹¹³⁷PI¹¹³⁸PI¹¹³⁹PI¹¹⁴⁰PI¹¹⁴¹PI¹¹⁴²PI¹¹⁴³PI¹¹⁴⁴PI¹¹⁴⁵PI¹¹⁴⁶PI¹¹⁴⁷PI¹¹⁴⁸PI¹¹⁴⁹PI¹¹⁵⁰PI¹¹⁵¹PI¹¹⁵²PI¹¹⁵³PI¹¹⁵⁴PI¹¹⁵⁵PI¹¹⁵⁶PI¹¹⁵⁷PI¹¹⁵⁸PI¹¹⁵⁹PI¹¹⁶⁰PI¹¹⁶¹PI¹¹⁶²PI¹¹⁶³PI¹¹⁶⁴PI¹¹⁶⁵PI¹¹⁶⁶PI¹¹⁶

Abb. 10: Vergleich von Gruppe II-Intron-ORFs

Die von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gruppe II-Intron-ORFs von *cob* in *S. pombe*, *aI1*, *aI2* in *S. cerevisiae* und *pI*-DNA in *P. anserina* sind so koordiniert, daß ein Maximum an Identität und konservativer Substituierung durch ein Minimum von Insertionen bzw. Deletionen erreicht wird. Die *aI1*- und *aI2*-Sequenzen (Bonitz et al., 1980) sind so verändert worden, daß AUA Methionin und nicht Isoleucin codiert (Hudspeth et al., 1982). Identische Reste in mindestens 3 der 4 ORFs sind eingerahmt. Die Gesamtsequenz ist in 6 Abschnitte eingeteilt (I bis VI), von denen die Regionen II, IV und VI, die besonders starke Aminosäurehomologien aufweisen, mit Klammern gekennzeichnet sind.

Abb. 11:

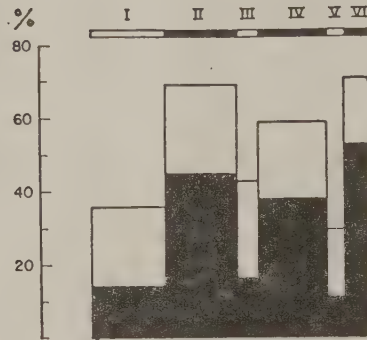


Abb. 11 zeigt die Aminosäurekonservierung zwischen dem *S. pombe* cob- und *S. cerevisiae* a11-ORF. Die Prozentzahl der identischen Aminosäuren (ausgefüllte Blöcke), sowie Homologien, wenn konservative Aminosäure-Substitutionen mit eingeschlossen werden (leere Blöcke), sind für die Regionen I bis VI dargestellt (Alignment siehe Abb. 10). Austausche innerhalb einer der folgenden Gruppen wurden als konservativ gezählt:

sauer : Asp (D), Glu (E);

basisch : His (H), Lys (K), Arg (R);

hydrophob : Ala (A), Val (V), Ile (I), Met (M), Pro (P),
Phe (F), Trp (W), Leu (L)

polar : Ser (S), Tyr (T), Gln (Q), Cys (C), Tyr (Y),
Asn (N)

Ähnliche Verwandtschaften können beobachtet werden, wenn paarweise das cob-Intron von *S. pombe* mit dem aI2 von *S. cerevisiae* oder dem pl-cox1-Intron von *P. anserina* verglichen wird (Tab.3). Weiterhin besteht eine starke Tendenz für Nukleotid-austausche in der dritten Position der Codons. Wenn man zum Beispiel innerhalb der Region II Codons untersucht, die nur einen Unterschied von einem Nukleotid zwischen dem cob-Intron von *S. pombe* und aI1 von *S. cerevisiae* zeigen, kann man feststellen, daß 70% der Unterschiede in der dritten Codonposition bestehen. Zusätzlich zeigt eine Anzahl von Aminosäureblöcken besonders hohe Konservierung von Resten, die möglicherweise für die Struktur oder Funktion des Proteins bedeutend sind. Zum Beispiel tauchen in Region VI in allen vier homologen Sequenzen zwei Paare von Cystein-Resten auf, jedes durch zwei verschiedene Aminosäuren voneinander getrennt. Die Position von Cysteinbausteinen in einem Polypeptid beeinflußt bekanntlich die Sekundärfaltung durch Ausbildung von Disulfidbrücken. In ähnlicher Weise sind eine große Anzahl von basischen Resten in Region VI konserviert, sowie Reste, die zu alpha-helikalen Strukturen (Glycin und Prolin) in Region II (siehe Abb.10) führen. In Gruppe I-Introns wurden zwei charakteristische Blöcke von Aminosäuren beobachtet (LAGLI-DADG) (Waring et al., 1982; Hensgens et al., 1983). Diese Blöcke weisen aber keine Homologie zu den konservierten Bereichen auf, die in den Introns hier diskutiert werden. Nur am Anfang von Region IV kann man eine Anhäufung von sauren, apolaren und Glycinresten erkennen.

Tab. 3: Verwandtschaftsgrad von Gruppe II-ORFs auf der Basis von Aminosäure-Homologien

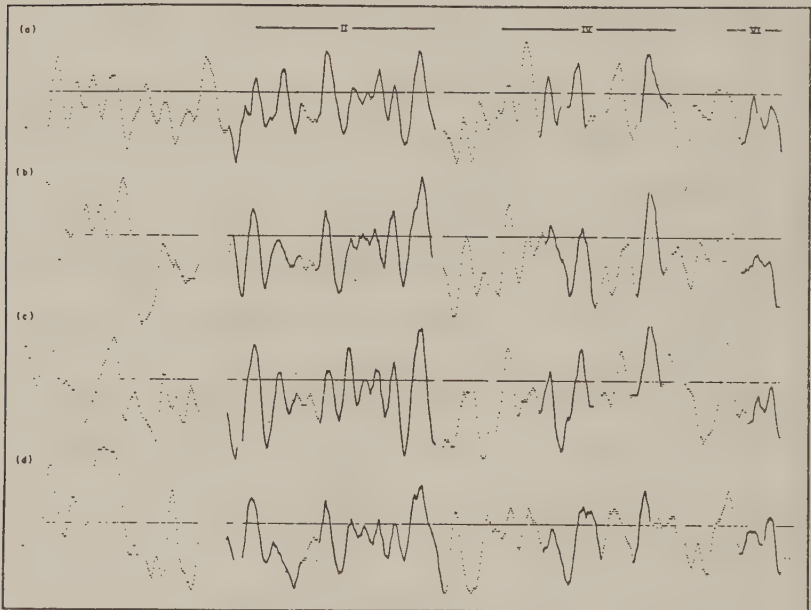
	Region					
	I	II	III	IV	V	VI
(a)						
S. pombe cob/ S. cerevisiae aI1						
% identischer Aminosäuren	14	45	16	38	11	53
% homologer Aminosäuren	36	69	43	59	30	71
(b)						
S. pombe cob/ S. cerevisiae aI2						
% identischer Aminosäuren	11	47	19	34	18	44
% homologer Aminosäuren	31	68	42	54	43	64
(c)						
S. pombe cob/ P. anserina pl-cox1						
% identischer Aminosäuren	7	49	13	34	6	35
% homologer Aminosäuren	28	67	29	54	34	60
(d)						
Quotient, gebildet aus der Anzahl von Austausch an 3. Codonposition zwischen dem cob-Intron von S. pombe und Intron aI1 von S. cerevisiae	0,38	0,70	0,28	0,58	0,40	0,80

Der paarweise Vergleich zwischen S. pombe und (a) S. cerevisiae aI1, (b) S. cerevisiae aI2 und (c) P. anserina pl-cox1 Introns ist anhand des Aligments aus Abb. 10 dargestellt. Der Prozentsatz identischer und homologer Aminosäuren, konservativ substituierte, sowie identische Positionen mit eingeschlossen, (Abb. 11) wurde für die Regionen I bis VI berechnet.

Der Quotient aus Austausch an der dritten Position von Codons ist ein Vergleich derjenigen S. pombe cob-Intron- und S. cerevisiae aI1-Codons, die einen Unterschied von nur einem einzigen Nukleotid zeigen.

Die homologen Regionen werden von Bereichen unterbrochen, die eine viel schwächere Nukleotid-Homologie zeigen und geringe, wenn überhaupt nachweisbare Übereinstimmung auf Proteinebene (Regionen I, III und V; Abb.10). So hat zum Beispiel Region I des cob-Introns von *S. pombe* keine Aminosäurehomologie mit aI1 von *S. cerevisiae* (14% Identität auf einer Länge von 248 Aminosäuren. Dies ist nicht überraschend, da sogar die untereinander näher verwandten Introns aI1 und aI2 von *S. cerevisiae* nur eine Identität von 23% auf Nukleotidebene in dieser Region aufweisen (gegenüber von 59% in Region II) und nur 35 % der einzelnen Austausche kommen in der Wobble-Position der Codons vor. Um zu untersuchen, ob diese Regionen geringer primärer Sequenz-Konservierung möglicherweise doch gemeinsame strukturelle Merkmale im Polypeptid besitzen, wurden die Hydrophobizitätsprofile der Intron-ORFs untersucht (Abb.12). Obwohl die Region I unterschiedliche Muster in den vier ORFs zeigt, ist ein Überschuß an polaren Aminosäuren in jedem der Fälle zu sehen; die Profile der Region III sind in allen vier ORFs ähnlich. Wie erwartet zeigen die konservierten Regionen II, IV und VI ähnliche Profile mit einem Trend zu hydrophilen Resten, besonders in der Region VI.

Abb. 12: Vergleich der Hydrophobizitätsmuster von Gruppe-II-ORFs



Die Hydrophobizitätsprofile der 4 Gruppe II-Intron-ORFs: (a) *S. pombe* cob-Intron; (b) *S. cerevisiae* a11; (c) *S. cerevisiae* a12; (d) *P. anserina* pl-cox1 wurden mit dem Durchschnitt von 5 Hydrophilizitätswerten und einer Spanne von 11 Werten berechnet (siehe Material und Methoden). Das Aminosäure-Alignment, das für die Profile benützt wurde, ist in Abb. 10 dargestellt. Herausragende Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Mustern sind mit durchgehenden Linien markiert.

1.7 Codonbenützung im cob-Gen

Die Region I des Intron-ORFs enthält im Vergleich zu downstream liegenden Abschnitten oder anderen *S. pombe*-Genen (Abb.13) eine große Anzahl an Codons mit C oder G in der dritten Position. Das Vorkommen selten benutzter Codons in Abschnitten konservierter RNA-Strukturen ist allen bisher untersuchten mitochondrialen Introns gemeinsam. Möglicherweise trägt der hohe G+C-Gehalt zur thermodynamischen Stabilität von helikalen Abschnitten bei. Ein Codon, das für das mitochondriale Genom von *S. pombe* ungewöhnlich ist und nur in diesem 5'-Intron-Bereich vorkommt, ist UGA. Ebenso wie Hefe- und Tiermitochondrien zeigt *S. pombe* eine starke Tendenz zum Gebrauch des Tryptophan-Codons UGG (Lang, 1984). Ähnlich wird die CGN-Familie selten in der cob-Exon-Sequenz benützt, jedoch sehr häufig im Intron-ORF. Ihr Vorkommen mag Reste des ursprünglichen ORF-Codon-Benutzungsmusters widerspiegeln. Alternativ könnte dies die Auswirkung des reduzierten Selektionsdrucks für Gene sein, die in geringen Mengen exprimiert werden, wie es für Maturasen der Fall ist. Gegen diese zweite Möglichkeit spricht ihr Vorkommen auch in Abschnitten starker Sekundärfaltstrukturen, also den Bereichen am 3'- bzw. 5'-Ende, durch die eine Annäherung der Exonsequenzen beim Spleißen ermöglicht wird.

Die Tatsache, daß auf eine Region nichtkonservierter N-terminaler Proteinsequenzen eine hochkonservierte Region folgt, ähnelt der Situation, wie sie bei den meisten Gruppe I-Intron-ORFs anzutreffen ist (Michel & Dujon, 1982; Waring et al., 1982; Hensgens et al., 1983). Zum Beispiel wurde für den Fall des cob-Introns bI4 von *S. cerevisiae* angenommen, daß nach der Translation der Exons B1 bis B4 und des offenen Leserahmens von I4 durch einen proteolytischen Schneideprozess die N-terminalen Sequenzen des Präkursorproteins entfernt werden. Dadurch würde die aktive Maturase frei werden, die an der Entfernung des Introns beiteiligt ist. (Weiss-Brummer et al., 1982; de la Salle et al., 1982; Anziano et al., 1982). Eine ähnliche Annahme wurde für das Gruppe II-Intron aI1 von *S. cerevisiae* gemacht (Carignani et al., 1983). In diesem Fall würde die Länge des vorhergesagten N-terminalen proteolytischen Schneideproduktes (ein p20-Polypeptid) gut mit der Einteilung des nicht konservierten 5'-Abschnittes (Region I) mit den downstream liegenden konservierten Regionen übereinstimmen. Die große Anzahl konservierter basischer Reste paßt gut zu einer RNA-Bindungsfunktion, die für am Spleißen beteiligte Komponenten erwartet wird.

Phe(F)	UUU 16(5/16)	Ser(S)	UCU 5 (8/26)	Tyr(Y)	UAU 17 (5/13)	Cys(C)	UGU 4 (5/10)
	UUC 22(3/ 6)		UCC - (1/ -)		UAC 4 (5/ 9)		UGC - (-/ -)
Leu(L)	UUA 43(6/26)	Pro(P)	UCA 13 (9/ 7)	Ter	UAA 1 (-/ -)	Trp(W)	UGA - (3/ -)
	UUG 2(6/ 2)		UCG - (-/ -)		UAG - (-/ 1)		UGG 7 (1/ 6)
Leu(L)	CUU 5(3/22)	Gln(Q)	CCU 10 (7/11)	His(H)	CAU 5 (2/16)	Arg(R)	CGU - (1/ 4)
	CUC - (1/ -)		CCC - (2/ -)		CAC 2 (2/ 2)		CGC - (1/ -)
	CUA 4(3/ 7)		CCA 13 (3/ 8)		CAA 3 (4/13)		CGA 1 (3/ 7)
	CUG 1(-/ -)		CCG 1 (1/ 1)		CAG - (4/ 2)		CGG - (-/ -)
Ile(I)	AUU 24(5/34)	Thr(T)	ACU 8 (2/21)	Asn(N)	AAU 21 (12/27)	Ser(S)	AGU 3 (8/ 7)
	AUC 10(3/ 8)		ACC - (1/ 3)		AAC 4 (4/ 6)		AGC 2 (2/ 2)
	AUA 10(9/11)		ACA 8 (8/ 5)	Lys(K)	AAA 7 (8/52)	Arg(R)	AGA 9 (9/24)
Met(M)	AUG 13(2/15)		ACG - (4/ 1)		AAG - (6/ 3)		AGG - (1/ -)
Val(V)	GUU 11(4/18)	Ala(A)	GCU 20 (4/20)	Asp(D)	GAU 11 (11/23)	Gly(G)	GGU 20 (6/18)
	GUC 1(3/ 1)		GCC 2 (-/ 2)		GAC 1 (3/ 4)		GGC - (1/ -)
	GUA 9(9/ 3)		GCA 5 (2/ 6)	Glu(E)	GAA 5 (3/16)		GGA 4 (13/11)
	GUG - (1/ 1)		GCG 1 (1/ 2)		GAG - (3/ 3)		GGG - (1/ 1)

Abb. 13:

Codonbenützung in *S. pombe* Exon- und Intron-Sequenzen:

In der ersten Spalte steht die Anzahl der Codons in den cob-Exonbereichen. Die Codonbenützung im Intron-ORF ist in Klammern dargestellt, wobei sich die erste Zahl auf die Region I bezieht und die zweite Zahl, durch einen Schrägstrich getrennt, auf die restlichen Regionen. Der Einbuchstabencode ist in Klammern neben den Aminosäurebezeichnungen aufgeführt.

2. Untersuchung von Deletionsmutanten im cob-Genbereich von *S. pombe*

2.1 Kurze Einleitung

Im ersten Teil der Arbeit wurde die DNA-Sequenz und die abgeleitete Proteinsequenz des Exon- und Intronleserahmens der cob-Region untersucht, woraus sich Aussagen über die Lage des abgeleiteten cob-Proteins innerhalb der Mitochondrienmembran, sowie die evolutionäre Stellung von *S. pombe*-Mitochondrien machen ließen. Durch charakteristische RNA-Sekundärfaltstrukturen und kurze konservierte Nukleotidabschnitte konnte das cob-Intron als Gruppe II-Intron klassifiziert werden. Im folgenden Teil sollte versucht werden, durch Analyse von Mutanten weitere Einblicke über die Funktion bestimmter DNA-Bereiche zu erhalten. *S. pombe* eignet sich wie auch *S. cerevisiae* für solche Untersuchungen sehr gut, da bei diesen Organismen im Gegensatz zu anderen Ascomyceten eine breite Palette von Punktmutationen und Deletionen mitochondrialer DNA zur Verfügung steht, die im allgemeinen nicht letal für die Zelle sind, da bei Ausfall der Zellatmung Energie über Fermentation gewonnen werden kann. Während jedoch bei *S. cerevisiae* Zellen mit sehr großen Deletionen mitochondrialer DNA (ρ^-) oder komplett fehlender mt DNA (ρ^0) lebensfähig sind, scheint *S. pombe* nicht ganz auf das mt Genom verzichten zu können, da bisher noch keine Mutanten dieser Art gefunden werden konnten. Da kerncodierte atmungsdefiziente Mutanten (pet^-) mit Defek-

ten in allen Komplexen der Atmungskette (Heslot et al. 1970; Wolf et al. 1971) und dem ATPase-Komplex (Boutry und Goffeau, 1982) lebensfähig sind, ist eine Beeinträchtigung der Atmung und Energiekonservierung jedoch nicht für die "petite-Negativität" verantwortlich.

In den folgenden Untersuchungen wurden Mutanten charakterisiert, die von Stämmen abgeleitet sind, in denen ein cytoplasmatischer Mutator aktiv ist, (Seitz-Mayr und Wolf, 1983) durch den die Mutationshäufigkeit bis auf mehrere Prozent erhöht ist. Phänotypisch sind diese Mutanten durch Atmungsdefizienz und Fehlen von Cytochrom b, Cytochromoxidase oder beider Enzyme im Tieftemperaturspektrum und Enzymtest charakterisiert. Aus diesen drei Gruppen wurden Mutanten untersucht, die kein aktives Cytochrom b mehr bilden können. Genotypisch handelt es sich dabei um Mutanten mit Deletionen zwischen 32 und 724 Basenpaaren Länge innerhalb des cob-Genbereiches. Mit Hilfe dieser Mutanten soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob bei *S. pombe* dieselben Mechanismen für Deletionsentstehung, wie sie von verschiedenen Autoren bereits für Bakterien, Viren und Säugerzellen postuliert worden sind, vorzufinden sind, und ob es vielleicht zwischen Deletionsentstehung und Spleißen einen Zusammenhang gibt. Gerade für diese letzte Fragestellung erscheint das cob-Gen mit nur einem Intron als ideales Untersuchungsobjekt.

2.2 Restriktionskartierung, Klonierung und DNA-Sequenzanalyse der Mutantenstämme:

Die physische Kartierung der Deletionsbereiche erfolgte durch Restriktion mit den in Abb.14 angeführten Enzymen und Vergleich der Restriktionsmuster der einzelnen Mutantenstämme mit den Mustern des Wildtypstammes 50 (Tab.4).

Für die Sequenzierung der Deletionsendpunkte der Mutanten wurden einzelne Restriktionsfragmente, in denen die Deletionen kartiert worden sind, in die Plasmide pBR 322 und pAYC 184 kloniert und damit *E. coli*-Stämme transformiert. Die Bezeichnung der daraus resultierenden Plasmidstämme, sowie die klonierten Mutanten-DNA-Abschnitte sind im Teil 1.6.1 in Tabelle 1 dargestellt. Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980). Durch Vergleich der *cob*-Wildtypsequenz des Stammes 50 mit den Schnittstellen der Deletionsmutanten lassen sich die 5'- und 3'-Deletionsendpunkte ermitteln. Die DNA-Sequenz im Bereich der Deletionsendpunkte ist in Abb.15 dargestellt.

Abb. 14:

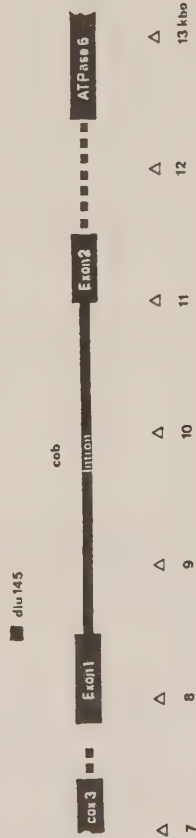
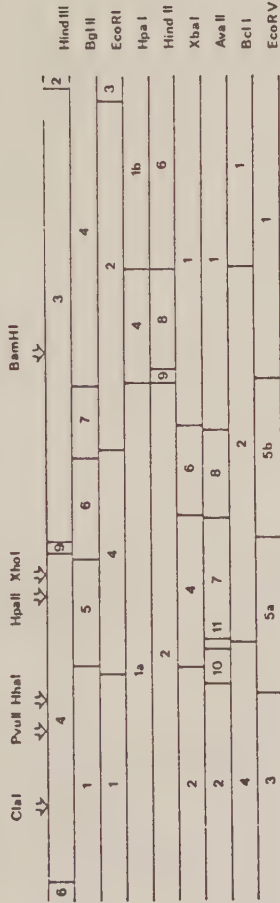


Abb. 14:

In Abb.14 ist die Lage der deletierten Sequenzen bei den einzelnen cob-Mutanten eingezeichnet (schwarze Balken). Als Orientierungshilfe ist im oberen Teil der Abbildung die Feinstruktur-Restriktionskarte des cob-Genbereichs dargestellt, im unteren Teil die Organisation des cob-Gens.

Tabelle 4:

Enzym:	Stamm	50	EB 4	EB 5	EB 7	EB 9	EB 11	EB 272	Sp 20a	Sp 49b	diu 130	diu 145
HindIII	1.	4,30	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
	2.	4,05	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
	3.	3,45	2,95	3,25	2,95	3,40	2,95	"	"	"	"	"
	4.	2,50	"	"	"	"	"	"	1,60	1,90	1,85	2,45
	5.	2,10	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
	6.	1,50	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
	7.	1,10	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
	8.	0,10	"	"	"	"	"	---	"	"	"	"
HindIII	3.	2,00	2,95	1,80	2,95	3,40	2,95					
+ BamHI		1,45		1,45								
HindIII	4.	2,35							1,40	1,90	1,71	2,31
+ XhoI		0,14							0,14		0,14	0,14
HindIII	4.	2,12							1,24	1,90	1,50	2,10
+ HpaII		0,36							0,36		0,36	0,36
HindIII	4.	1,36							1,60	1,13	1,85	1,20
+ PvuII		1,13								0,81		1,26
HindIII	4.	1,84							1,60	1,25	1,20	1,80
+ ClaI		0,65								0,65	0,65	0,65

2.3 Einteilung der Mutanten

Aufgrund ihrer Position im cob-Genbereich lassen sich die Mutanten in verschiedene Gruppen einteilen:

I. Exon 1-Mutanten:

In diese Gruppe fallen die Mutanten:

-Sp 20a mit einer Deletionslänge von 724 bp. Der 5'-Deletionsendpunkt liegt 51 bp vor dem ATG-Initiationscodon in der Leader-Region des cob-Gens, der 3'-Deletionsendpunkt liegt 11 Basenpaare upstream des Spleißpunktes zwischen Exon 1 und der Intronsequenz.

-diu 130 mit einem Deletionsbereich von 498 Basenpaaren, der sich von Position +14 bis Position 513 erstreckt.

-diu 145 mit einer Deletionslänge von 46 bp. stellt einen Übergang zu den Mutanten mit Deletionen im Intron dar, da in diesem Fall auch noch der Spleißpunkt und ein kleiner Teil des Introns betroffen sind.

II. Intron-Mutanten:

-Sp 49b mit 420 bp, EB 272 mit 34 bp und EB 9 mit 37 bp Deletionslänge. Die Deletionsbereiche überlappen sich dabei nicht.

III. Exon 2-Mutanten:

Dem Exon 2-Genbereich lassen sich insgesamt vier Mutanten zuordnen: EB 4, EB7 und EB 11 wurden aus unterschiedlichen Ansätzen isoliert, sind aber bezüglich der lokalisierten Deletionsbereiche von 541 bp vollkommen identisch. Die 5'-Deletionsendpunkte liegen exakt an der 3'-Intron Spleißstelle, die 3'-Deletionsendpunkte wurden 62 Basenpaare in 3'-Richtung vom Stopp-Codon des Exon 2-Bereiches gefunden. Der Deletionsbereich der Mutante EB 5 mit 219 bp liegt innerhalb von Exon 2 und endet kurz vor dem TAA-Stopp-Codon.

2.4 Verteilung von Deletionen auf dem mt Genom von S. pombe.

Die meisten der bisher kartierten Deletionen (Ahne et al., 1984) liegen innerhalb der beiden Mosaikgene *cox1* und *cob*. Dies ist nicht überraschend, denn jedes Gen entspricht längenmäßig einem Viertel des Gesamtgenomes. Im Gegensatz dazu wurden nur eine (möglicherweise zwei) Deletionen in den durchgehenden Genen *cox2* und *cox3* gefunden, keine dagegen in den kurzen Genen für die Untereinheiten 8 und 9 der ATPase. Ein Grund, warum Deletionen in diesem Bereich nicht in der Mutantenkollektion vorhanden sind, könnte sein, daß zwischen *cob*-Exon 2 und dem *cox2*-Gen 19 von 25 tRNA-Genen lokalisiert sind (Lang et al., 1983). Da *S. pombe* als petite-negative

Hefe anscheinend ohne mitochondriale Protein-Synthese nicht überleben kann, würde jede Deletion, die tRNA- oder rRNA-Gene betrifft, letal sein. Eine ähnliche Situation wurde bei mitochondrialen Deletionsmutanten der obligat aeroben Spezies *Neurospora crassa* und *Neurospora intermedia* (Bertrand et al. 1983) gefunden.

2.5 Direkt repetierte Sequenzen an den Deletionsendpunkten:

Bei näherer Betrachtung der Deletionsendpunkte fallen bei allen Mutanten außer den Exon 2-Mutanten EB 4, EB 5, EB 7 und EB 11 Strecken direkt repetierter Sequenzen mit Längen bis zu 9 Basenpaaren auf, in welchen die Schnittstellen der Deletionen liegen (Abb.15). Mit Ausnahme der Mutante diu 130, wo eine perfekt repetierte Sequenz vorliegt, lassen sich die direkten Sequenzwiederholungen der übrigen Mutanten in einzelne Blöcke aufteilen, die durch maximal zwei nicht-passende Basenpaare voneinander getrennt werden. Bedingt durch die repetierten Sequenzen lassen sich daher die Deletionsendpunkte nicht exakt definieren, sondern können innerhalb eines Repeat-blockes verschoben sein. Bei der Mutante Sp 20a konnte dagegen aufgrund der Lage der repetierten Blöcke der Deletionsendpunkt exakt definiert werden.

Abb. 15:

EB 4, 7, 11:

5'--GTCTTAGTCAATgattgataacaata.....ataatatttaataaaaAGCTCATCAAAAGGTA--3'
 <-----deletiert----->
 541 bp
 -3202- -3761-

EB 5:

5'--AGATTTCTCAGCTattagaggtaatagt.....gctcaattAACGATAATCTCTCCGCCCTTA--3'
 <-----deletiert----->
 219 bp
 -3456- -3700-

EB 9:

5'--TCTTGATGTACGACAAattattggttttagcgaattctattattagagggttagcataattattattTCTTTTGTTCATAA--3'
 <<<<<<-----deletiert----->>>>>>
 41 bp
 -2549- -2614-

Sp 49b:

5'--TAATGTAAAGAGGATTAGTACaggatcagg.....tctcatggatttagaccaggTCGAAGTTGTCA--3'
 <<<<-----deletiert----->>>>
 420 bp
 -1283- -1728-

```

dlu 145:
      46 bp
      <-----deletiert----->
5'---TGGACAGAAATCCCAATGaacccgtattatctgataaattgcggttggtatatatgtgaCCCTCATAGAGAAAG--3'
      == =====
      0625

dlu 130:
      498 bp
      <<<<<<<-----deletiert----->>>>>>>
5'---TTTATGAAATTTTAAATctaatcctttt.....attagtgatcctaactctTAATAATAGAT--3'
      =====
      0005

Sp 272:
      34 bp
      <<<<<-----deletiert----->>>>
5'---TTGGTGGATTGAAGGAGATattaaagctgtttgattctatccctcatgataaattGGCTCTATTATCTTAATAA--3'
      =====
      1781

Sp 20a:
      724 bp
      <-----deletiert----->
5'---CCTTCARATTTTGACTATTtgcataat.....cccgattattGATAAAATTGCGCC--3'
      ==,=====
      -0060
  
```

Abb. 15:

DNA-Sequenz der Deletionseindpunkte der cob-Mutanten: Deletierte Sequenzen sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Direkte Sequenzwiederholungen sind unterstrichen (==); Bereiche, innerhalb derer die Deletionseindpunkte verschoben werden können sind durch Klammern (>>) gekennzeichnet. Zur Orientierung sind jeweils zwei Nukleotidpositionen angegeben, die sich auf das Initiationscodon (0001) des cob-Gens beziehen.

Das Vorkommen von direkt repetierten Sequenzen erinnert an Deletionsendpunkte, wie sie für Deletionsmutanten in *E. coli* gefunden wurden. Farabaugh et al. (1978) untersuchten spontane und UV induzierte Mutationen, die das lac I-Gen von *E. coli* betrafen. Ein großer Teil der Mutanten trug Deletionen von 9 bis 123 bp zwischen kurzen homologen DNA-Abschnitten mit einer Länge von 4 bis 8 Basenpaaren. Dabei zeigte sich, daß die Häufigkeit von Deletionen mit der Anzahl der homologen Nukleotide, aus denen die Repeats bestehen, ansteigt und gleichzeitig mit dem zunehmenden Abstand dieser Repeats fällt.

Der Mechanismus, der zur Entstehung solcher Mutanten führt, läßt sich mit dem Modell von Streisinger (1966) erklären, das anhand von Frameshiftmutanten des Phagen T4 entwickelt wurde. In DNA-Abschnitten mit gleichen Nukleotiden oder Nukleotidgruppen könnten durch einen Verlust von Nukleotiden in einem Strang der Doppelhelix der aufgeschmolzene Strang am Gegenstrang entlanggleiten und mit diesem fehlpaaren, wobei es zu einer Schleifenbildung im intakten Strang kommt. Nach Schließen der Lücke durch Ligation wäre das Deletionseignis nach einer Replikationsrunde abgeschlossen. Dieses Modell wurde von Alessandra et al. (1981) nach Untersuchungen von langen

Deletionen (700-1000 bp) erweitert. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß sechs von elf direkt-repetierten Sequenzen mit Längen von mehr als sechs Basenpaaren in der Mutantensammlung als Hotspots verwirklicht waren. In dem Hotspot, der am häufigsten auftrat, waren von 17 Basenpaaren 14 homolog, wobei eine Veränderung der Hotspotsequenz die Benützungshäufigkeit als Deletionsendpunkt verringerte. Signifikante Aussagen über Korrelation von Repeatlängen und Hotspots lassen sich bei *S. pombe* momentan noch nicht machen, da nicht genügend Deletionsmutanten zur Verfügung stehen. In Abb.16 ist dieses erweiterte "Slipped-mispairing" Modell schematisch dargestellt, in Abb.17 ist als Beispiel die *S. pombe*-Mutante *diu 130* in Analogie zu diesem Modell abgebildet. Durch die oben beschriebenen Mechanismen lassen sich jedoch nicht alle untersuchten Deletionen, weder bei *E. coli* noch die in dieser Arbeit beschriebenen bei *S. pombe* erklären. Unter spontan entstandenen Deletionen mit bekannter DNA-Sequenz im *lac I*-Gen von *E. coli* wurden bei 5 von 12 Deletionsendpunkten keine direkt-repetierten Sequenzen gefunden. Blickman und Riply (1984) stellten nach Vergleich der DNA-Sequenzen an den Deletionsendpunkten und in den benachbarten Regionen ein Modell auf, durch das sich die Spezifität solcher Endpunkte erklären läßt. Sie konnten zeigen, daß sich bei allen 12 Mutanten, auch bei denen mit direkten Repeats an den Enden, Palindromstrukturen bilden lassen, durch welche sich sonst weit voneinander entfernte DNA-Sequenzen in enge Nachbarschaft bringen lassen.

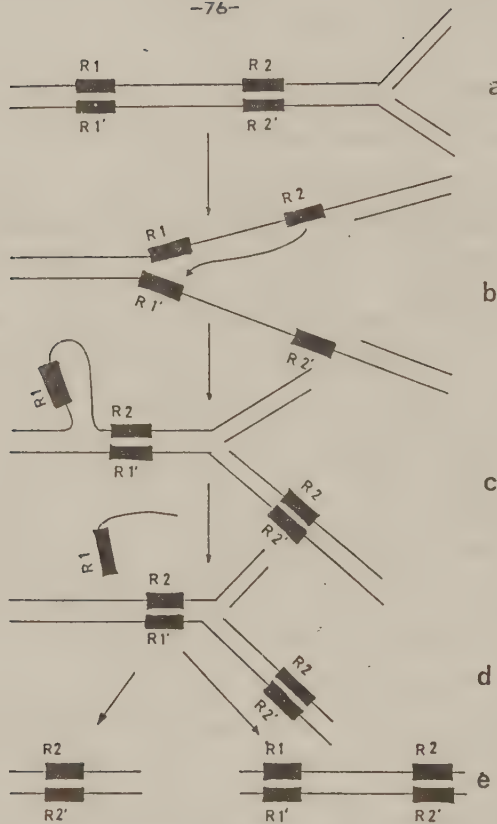


Abb. 16

In Abb. 16 ist das erweiterte "Slipped-mispairing" Modell nach Albertini et al. (1982) dargestellt. R1 und R2 kennzeichnen direkt repetierte Sequenzblöcke. Die Komplementärsequenzen dazu sind R1' und R2' (a). Während der Replikation kann R2 am Gegenstrang entlanggleiten (b) und mit R1' paaren (c), wobei es zu einer Schleifenbildung im oberen Strang kommt. Nach Excision des Loops (d) und einer weiteren Replikationsrunde ist das Deletionseignis abgeschlossen (e).

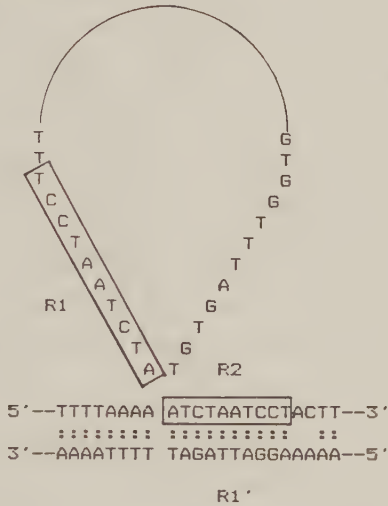


Abb. 17:

Mögliche Struktur an den Deletionsendpunkten der Mutante diu 130 in Analogie zum "Slipped-mispairing" Modell. (Abb.16)
Blöcke direkt repetierter Sequenzen (R1, R2) sind umrahmt.

Durch die starke Selbstkomplementarität der DNA können sich so Rückfaltstrukturen ausbilden, ohne daß direkt-repetierte Abschnitte erforderlich sind. Diese Zwischenstrukturen könnten als Substrat für Excisionsenzyme dienen. In Analogie zu diesem Modell wurden alle in dieser Arbeit untersuchten cob-Mutanten auf Palindromsequenzen in der Nähe der Deletionsendpunkte geprüft. Nur bei der Mutante EB 5, an deren Deletionsendpunkten keine direkt repetierten Sequenzen gefunden werden konnten, läßt sich eine Palindrom-ähnliche Struktur bilden (Abb.18). Es lassen sich jedoch keine Aussagen machen, wie stabil eine derartige Struktur sein muß, damit solche Reaktionen ablaufen können. Da sich bei allen anderen Mutanten solche Strukturen nur sehr mühsam unter Einbeziehung von bulge-loops, T-G-Paarungen und Auslassungen bilden lassen, scheint ein derartiger Mechanismus bei *S. pombe* sehr fraglich zu sein.

In mitochondrialen Genomen von Pilzen konnte eine Beteiligung von direkt-repetierten und palindromen Sequenzabschnitten an Deletionseignissen bereits nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um rho-Mutationen, die bisher nur bei petite-positiven Hefen (*Saccharomyces*-Spezies und *Torulopsis glabrata* (Clark Walker et al., 1981) gefunden wurden. Charakteristisch für rho-Mutanten sind Makrodeletionen der mitochondrialen DNA, wobei die im rho-Genom verbliebenen Sequenzen bezüglich Größe und Anordnung variieren (Faye et al., 1973) und bis zu vielen Malen reiteriert vorliegen können (Faye et al. 1973; Lazowska et al., 1974). In Folge der ausgedehnten Deletionen können

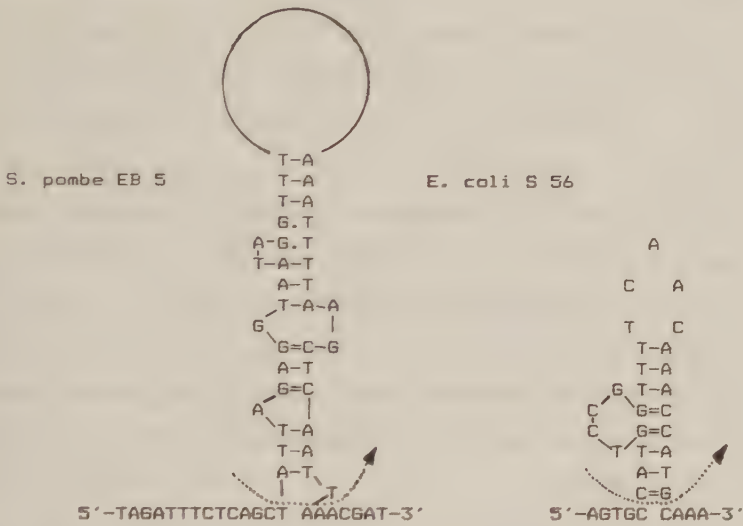


Abb. 18:

Mögliche Rückfaltstrukturen an den Deletionsendpunkten der Mutante EB 5; Im Vergleich dazu ist das Deletionsmodell für die Mutante S 56 im lac-I-Gen von E. coli dargestellt (Glickman und Ripely, 1984).

diese Mutanten keine mitochondrialen Proteine mehr herstellen. Für den Excisionsmechanismus in rho-Mutanten wurden verschiedene Modelle diskutiert. Der einfachste Weg läßt sich mit der Excision und Integration des Phagen Lamda vergleichen. Durch den Schneideprozeß wird ein zirkuläres Monomer gebildet, das solange amplifiziert wird, bis die entgültige Genomlänge erreicht ist. Bei verschiedenen spontan entstandenen oder durch Ethidiumbromid (EB) induzierten Mutanten wurde gefunden, daß die Excisionssequenzen aus perfekten Palindromen bestehen, die oft an einer oder beiden Seiten von Bereichen flankiert werden, die keine perfekten Homologien zeigen. In spontanen Mutanten findet die Excision an AT-Spacersequenzen und GC-Clustern intergenischer Abschnitte statt (Bernardi und Baldacci, 1980), während bei EB-induzierten Mutanten auch in Exon- und Intronsequenzen excisiert wird (Baldacci und Bernardi, 1983).

Von Sor und Fukuhara (1983) wurde ein Modell für die Entstehung palindromer Petites postuliert. Sie fanden, daß die Palindrome nicht symmetrisch zu den Junktion-Punkten liegen, sondern immer eine asymmetrische Region von variabler Länge vorhanden ist, die von kurzen invertierten Sequenzen begrenzt wird. Bei der Excision, so wird von den Autoren postuliert, kommt es an jeder der invertierten Sequenzen zu einem Einzelstrangsnchnitt, so daß danach die komplementären Stränge ungleich lang sind. Dadurch werden die überhängenden Einzelstränge zu den Junktion-Sequenzen zwischen den palindromisch-repetierten Bereichen.

Bei *S. pombe* konnten bis jetzt noch keine Anhaltspunkte für einen Deletionsmechanismus gefunden werden, der nach obigen Schema ablaufen könnte, zumal im Gegensatz zu *S. cerevisiae* keine GC-Cluster und AT-reiche Spacersequenzen im mt Genom existieren.

In Anbetracht der bisher diskutierten Deletionsmodelle ist anzunehmen, daß alle Deletionen mit direkt repetierten Sequenzen an den Endpunkten auch durch illegitime Rekombination zustande kommen können, bei der es in einem Vierstrangstadium zur Paarung der direkt repetierten Sequenz jeweils eines Stranges mit der komplementären Sequenz des Gegenstranges kommt. (Abb.19)

Abb. 19

diu 130:

```

5'--TTTATGAAATTTTAAATcctaactctttt
.....
3'--AAATACTTTTAAATTTtagattaggaaaa
      :  :  *****  :
      atttagtgatatctaactcctACTTTAA--3'
..
.  taaatcacatagattaggaTGAAATT..5'
.
.....deletiert.....

```

Sp 272:

```

5'--TTGGTGGATTGAAGGAGATattaagctgttttga
3'--AACCACCTAAGTTCCTCTataattcgaacaaaact
      : : : : : ***** : :
      ctcatgataaATTAATTGCTCTATT--3'
      ..
      . gagtactattTAATTAACGAGATAA--5'
      .
      .....deletiert.....

```

Sp. 20a:

```

5'--CAAATTTTGGACTATTtctc-gataatgattgtt
                                     .....
3'--GTTTAAAAACTGATAAatag-ctattactaaca
      :   :   :   :   :   :   :   :
      cgcgatt-ATCTGATAAA-ATTGCG--3'
      ..
      . ggcataa-TAGACTATTT-TAACGC--5'
      .
      .....deletiert.....

```

Abb. 19

EB 9:

```

5'--TCTTGATGTACGACAAattattggttagc
3'--AGAACTACATGCTGTTtaataaccaaactg
      :::::  *****  :::
      ttacgat-AATTATTATTCTTTTGTC--3'
      ..
      . aatgcta-TTAATAATAAGAAAACAGT--5'
      .
      .....deletiert.....
  
```

Sp 49b:

```

5'--TAATGTAAGAGGATTTAGTACAGGatcagg
3'--ATTACATTCTCCTAAATCATGTCctagtc
      :::::  *****
      catggatttagaccaggTCGAAGTTGT--3'
      ..
      . gtacctaaatctggtccAGCTTCAACA--5'
      .
      .....deletiert.....
  
```

diu 145:

```

5'--TGGACAGAATCCAATGAAcccggtattatctgataaa
3'--ACCTGTCTTAGGGTTACTTgggcataatagactattt
      ::  *****  ::
      atatgtgtacCCTCATAGAGAAAG--3'
      ...
      . tatacacatGGGAGTATCTCTTTC--5'
      .
      .....deletiert.....
  
```

Abb. 19:

Abb. 19 zeigt einen Deletionsmechanismus, der auf Rekombination homologer repetierter Sequenzen in einem Vierstrangstadium basiert. Deletierte Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt bzw. durch Punkte ersetzt, mögliche Basenpaarungen an homologen Sequenzen sind mit Punkten (:) eingezeichnet. Homologe Abschnitte, in denen sich die Deletionenpunkte verschieben lassen, sind durch Sterne (*) markiert.

Abb. 20:

```

Stamm 50      3'-Spleißpunkt
              -----Intron-----> <-----Exon II-----
              5'--NNNCTTAGTTCAAT gatttgataacaatatnnn---3'
                                <---deletiert bei-----
                                EB 4,7,11
    
```

In Abb. 20 sind die 5'-Deletionsendpunkte der Mutanten EB 4, 7 und 11 dargestellt. Der deletierte Bereich (in Kleinbuchstaben dargestellt) beginnt exakt am 3'-Ende des Introns.

Abb. 21:

```

              5'-Spleißpunkt
              ----- Exon 1 -----> <----- Intron ---
Stamm 50  5'--NNNCCGTATTATCTGATAAAA TTGCGCCGTTNNN---3'
EB 4,7,11 5'--nnngtataatattttaataaaa AGCTCATCAANNN---3'
              ---deletiert----->
    
```

Abb. 21 zeigt Homologien auf Nukleotidebene zwischen den Deletionsendpunkten der Mutanten EB 4, 7, 11 mit der Sequenz am 5'-Spleißpunkt des cob-Introns. Identische Basen sind mit Punkten (:) gekennzeichnet.

2.6 Deletionen an Exon-Intron-Grenzen

Die Mutanten EB 4, EB 7 und EB 11, sind zwar unabhängig voneinander isoliert worden, zeigen jedoch völlig identische Deletionen. Ihre Entstehung läßt sich durch keines der vorher diskutierten Deletionsmodelle erklären. Der Umstand, daß bei diesen Mutanten die 5'-Deletionsendpunkte exakt mit der 3'-Intron-Exon-Grenze übereinstimmt (Abb.20) legt einen Zusammenhang von Deletionsentstehung und RNA-Spleißen nahe. Gargouri et al. (1984) konnten bei *S. cerevisiae* zeigen, daß spleißdefekte Mutanten mit Mutationen in den Introns des *cob*-Gens zu atmungskompetentem Wildtypzustand revertieren können. Die Untersuchung der DNA-Sequenz zeigte ein überraschendes Ergebnis: Bei den Revertanten waren die Intron-DNA-Sequenzen genau an den Stellen excisiert, an denen RNA-Spleißen erfolgte. In der Mehrzahl der Fälle geschieht dies spontan mit einer Häufigkeit von $0,2 \times 10^{-4}$ bis 2×10^{-3} , was ungefähr der gleichen Häufigkeit von Rückmutation oder Suppression entspricht. Zur Interpretation dieser Ergebnisse diskutiert Gargouri verschiedene Hypothesen:

- 1) Die Prozessierung des Gens könnte durch Rekombination einer revers-transkribierten reifen m-RNA oder unvollständig gespleißter Prä-mRNA mit der genomischen DNA erfolgen. Ein solcher Mechanismus würde das Vorhandensein von reverser Transkriptase in Mitochondrien voraussetzen.

2) DNA-RNA-Rekombination an Heteroduplexstrukturen, die aus reifer mRNA oder partiell-gespleißter Prä-mRNA bestehen, könnte zu solchen Excisionen führen. Dabei könnten beispielsweise mRNA-Maturasen beteiligt sein.

In den oben beschriebenen Fällen wird die gesamte Intron-Sequenz deletiert, wobei beide Deletionsendpunkte mit den Spleißpunkten identisch sind. Bei den Mutanten EB 4, EB 7 und EB 11 von *S. pombe* ist im Gegensatz dazu das gesamte Exon II und noch 62 bp nach dem 3'-Ende deletiert. Wie lassen sich die 3'-Deletionsendpunkte erklären, wenn man eine Beteiligung der oben diskutierten Mechanismen an der Deletionsentstehung dieser Mutanten in Erwägung zieht? Vergleicht man diese Endpunkte mit den Sequenzen am 5'-Spleißpunkt des Introns, so läßt sich eine deutliche Ähnlichkeit erkennen. Von 14 Basenpaaren sind in diesem Bereich 12 identisch (Abb.21), wobei die Identität genau am Spleißpunkt abbricht.

Nicht erwartete Gemeinsamkeiten von Deletionsendpunkten und Spleißsequenzen lassen sich auch bei Mutanten mit direkten Repeats an den Deletionsendpunkten finden. Bei Vergleich der Sequenzen an den 3'-Deletionsendpunkten der Mutanten EB 9, EB 272 und Sp 20a mit den Sequenzen am 5'-Spleißpunkt des cob-Introns lassen sich ebenfalls Sequenzmotive finden, die einander ähnlich sind (Abb.22). Bei der Mutante diu 130 liegt der 3'-Deletionsendpunkt minimal nur vier Basenpaare von dem Punkt entfernt, wo Introns in den cob-Genen von *S. cerevisiae*

Abb. 22:

Spleißpunkt

```

-----Exon I----->---Intron---
Stamm 50      5'--NNNAACCCGTATTATCTGATAAAATTGCGCCGTTNNN-3'

Sp 20a      5'--nnnaaccggtattatCTGATAAAATTGCGCCGTTNNN-3'
             -deletiert----->
             :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EB 272      5'--nngattctatccctcatgataaattaaTTGCTCTNNN-3'
             -deletiert----->>>>
             :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EB9         5'--nnattattagaggtacgataattattATTCTTTNNN-3'
             -deletiert----->>>>>>

```

In Abb. 22 sind Sequenzvergleiche zwischen den 3'-Deletionsendpunkten der Mutanten Sp 20a, EB 272 und EB 9 und den Sequenzen am 5'-Spleißpunkt des Stammes 50 dargestellt. Identische Nukleotide sind mit Punkten (:) gekennzeichnet. Direkt repetierte Sequenzen, innerhalb derer die Deletionsendpunkte verschoben werden können, sind mit Klammern (>>) markiert.

```

<<<-<<<---deletiert-----
S.p 49b 5'---NNNAATGTAAGAGGATTAGTAcag-gatcaggacgatcaaann--3'
      : : : : : : : : : : : :
A.n I1 5'---NNNTTGG-AGGAGG-TTTA-TACACAGATNNN--3'
      -----Exon----->X-----Intron-----
S.c b13 5'---NNNNNTG-AGGTGGGTTTAATATAGAGNNNN--3'
      : : : : : : : :
EB 272 5'---NNNNNACTTGGTGGATTGAAGGAGATattaagcttggtttttnnn--3'
      : : : : : : : <<<<-----deletiert-----
diu 130 5'---ntattatgggtgggatttagtgtatctaatcctACTTTAAATANN--3'
      -----deletiert----->>>>>>>>>>

```

Abb. 23:

Vergleich von Deletionsendpunkten der Mutanten diu 130, Sp 49b, EB 272 und Alignment mit den Sequenzen, wo bei *S. cerevisiae* (S.c) und *A. nidulans* (A.n) im cob-Gen die Introns b13 und I1 inseriert sind. Deletierte Sequenzen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, direkt repetierte Sequenzen, innerhalb derer sich die Deletionsendpunkte verschieben lassen, sind durch Klammern (>>) gekennzeichnet, Bereiche ähnlicher Sequenzen sind eingerahmt, identische Basenpaare mit Punkten (:) gekennzeichnet.

(Intron bI3) und *A. nidulans* inseriert sind. Bezieht man die Mutanten Sp 49b und EB 272 mit ein, lassen sich zusätzlich noch gemeinsame Sequenzmotive in der Nähe der Deletionsendpunkte erkennen (Abb. 23). Daraus läßt sich schließen, daß in *S. pombe* von einem Deletionsmechanismus nicht nur Sequenzen benützt werden, die am RNA-Spleißen beteiligt sind, sondern offensichtlich auch Sequenzen erkannt werden, die Spleißpunkten nur ähnlich sind. Bei *S. cerevisiae* konnte bei drei Mutanten mit Deletionen im *cox1*-Gen gezeigt werden, daß die 5'-Deletionsendpunkte exakt mit der Grenze zwischen Intron a11 und Exon A2 korrespondieren (G. Weiller, pers. Mitteilung). Daß die 3'-Deletionsendpunkte dieser Mutanten ebenfalls mit einer Exon-Intron-Grenze zusammenfallen oder Eigenheiten solcher Sequenzen beinhalten, konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden.

Für eine Beteiligung der von Gargouri et al. (1983) postulierten Mechanismen an der Deletionsentstehung bei *S. pombe* sprechen auch folgende Ergebnisse: Durch Computeranalysen konnten Michel und Lang (1985) nachweisen, daß die in den Gruppe II-Introns a11, a12 im *cox1*-Gen von *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980), dem *P. anserina* p1-Intron (Osiewicz und Esser, 1984), dem in dieser Arbeit beschriebenen *cob*-Intron von *S. pombe*, sowie dem mitochondrialen Mauriceville-Plasmid von *N. crassa* (Nargang et al., 1984) möglich codierte Polypeptid auf Aminosäureebene Homologien zu einer Familie von RNA-abhängigen Polymerasen hat. Dazu zählen die Produkte von Pol-Genen bei Retroviren, bei einem Copia-ähnlichen Element sowie verwandte Proteine, die im Cauliflower-Mosaik- und

Hepatitis-B-Viren gefunden wurden. Von Steinhilber und Cummings (1985) konnte Reverse-Transkriptase-Aktivität während der Seneszenz von *P. anserina* durch in Vitro-Tests nachgewiesen werden. Unter Seneszenz versteht man einen Alterungsvorgang bei *P. anserina*-Mycelien, während dem bestimmte Regionen der mitochondrialen DNA aus dem Genom excisiert und als autonom-replizierende Plasmide amplifiziert werden. Von Wright und Cummings (1983) wurde gefunden, daß das oben beschriebene pl-Plasmid, das identisch mit dem ersten *cox1*-Intron ist, in den Kern transponiert wird. Daß es sich bei einzelnen Introns um Relikte von Transposons handeln könnte, wurde von Grivell (1984) bereits angedeutet. Die Tatsache, daß sich die meisten Introns aufgrund gemeinsamer Eigenschaften in Klassen einteilen lassen, deutet darauf hin, daß sie zu einer Multigenfamilie zu zählen sind, die von gemeinsamen Vorfahren durch Genduplikation und Transposition im Laufe der Evolution hervorgegangen ist. In den meisten bakteriellen Transposons ist eine Transposase codiert, ein Enzym das die Insertion an einer beliebigen Stelle im Genom ermöglicht. Voraussetzung dafür ist zunächst das exakte Herausschneiden des transponierbaren Elements an den beiden Enden, wie es auch beim RNA-Spleißen erforderlich ist. Beweise, daß in Introns Transposasefunktion codiert sein kann, liefern jüngste Untersuchungen von Macreadie et al. (1985) und Dujon et al. (1985). Die Autoren konnten nachweisen, daß im ORF eines optionalen Introns, das im 21s-rRNA-Gen bestimmter

Stämme (ω^+) von *S. cerevisiae* vorkommt, ein Protein codiert ist, das für die Transposition dieses Introns in intronlose ω^- Stämme verantwortlich ist. Die Integration dieses Introns ist abhängig von der intakten Erkennungssequenz für eine spezifische Endonuclease, die einen Doppelstrang-schnitt an der Zielsequenz katalysiert. Wenn man von einer durchschnittliche Länge von ca. 1000 bp. für ein Gen ausgeht, so wäre es durchaus denkbar, daß im 2400 bp langen *cob*-Intron von *S. pombe* neben der postulierten Reversen Transkriptase vielleicht noch eine Transposaseaktivität codiert ist.

Dagegen würden die Ergebnisse sprechen, die von Carigani et al. (1983) aufgrund genetischer und biochemischer Untersuchungen an Mutanten im Gruppe-II *cox1*-Intron *a11* von *S. cerevisiae* erhalten wurden. Danach ist im Intronleserahmen von *a11* eine Maturase codiert, die an der Excision des Introns mit beteiligt ist. Dieser vermeintliche Widerspruch, einerseits Verwandtschaft des in Gruppe II-Introns codierten Polypeptids zu Reverser Transkriptase, - andererseits Maturaseaktivität besteht nach Michel und Lang (1985) jedoch nicht. Im *1rRNA*-Intron von *Tetrahymena*, einem der wenigen nukleären Gruppe I-Introns (Michel und Dujon, 1983) konnte gezeigt werden, daß die Excision der Introns aus dem primären Transkript durch einen Mechanismus erfolgt, der mit "Self-splicing" bezeichnet wird (Cech et al., 1981; Zaugg et al., 1983; Kruger et al., 1982). Für das erste *cob*-Intron von *N. crassa* wurde dieses Phänomen von Garriga und Lambowitz (1984) nachgewiesen. Dabei ist keine Hilfe eines Proteins nötig, sondern durch die spezifische Rückfaltstruktur der Intron-RNA fungiert die RNA

selbst als "Ribozym". Maturasen fungieren demnach sozusagen nur als verzichtbare Beigaben in der Zelle, die sich im Laufe der Evolution aus RNA-erkennenden Enzymen entwickelt haben könnten. Der Besitz einer speziellen Reversen Transkriptase könnte einen Vorteil für die Erhaltung und Verbreitung von strukturierten Introns in Genomen von Organellen haben, während er ohne Nutzen für die alltäglichen Funktionen im Leben eines Organells ist. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß "Self-splicing" im cob-Intron von *S. pombe* nicht stattfindet (S. Distler, pers. Mitteilung).

In diesem Zusammenhang sollen noch kurz die Ergebnisse von RNA-Untersuchungen (S. Distler, pers. Mitteilung; Lang et al., 1983) erwähnt werden, die darauf hindeuten, daß bei *S. pombe* die durch Deletionen betroffenen Domänen unterschiedliche Spleißfunktionen innehaben. Im Stamm 50 wird für die cob-Region ein Präkursortranskript, bestehend aus einem kurzen Leader, dem cob-Exon 1, dem Intron und dem Exon 2 mit einer Gesamtlänge von ca. 3900 Nukleotiden hergestellt. Durch Prozessierungsschritte entstehen aus dem Primärtranskript eine reife cob-mRNA mit ca. 1300 b Länge, sowie zwei Intron-Transkripte von 2500 b und 2300 b. Mutanten mit Deletionen in den Exonbereichen stellen beide Introntranskripte her, jedoch keine Exontranskripte, während in der Intronmutante EB 9 nur noch das größere der beiden Transkripte hergestellt wird. In der Mutante Sp 49b wurde dagegen keines der Introntranskripte gefunden. Die Länge der Präkursortranskripte steht dabei in Korrelation zu den Deletionslängen.

Um genauere Aussagen über die Funktionen der einzelnen Domänen machen zu können, wird es notwendig sein, noch mehr Mutanten zu analysieren. Am besten dafür geeignet sind Mutanten mit sehr kleinen Deletionen und Punktmutationen, welche den gesamten Intronbereich möglichst lückenlos abdecken.

IV. Zusammenfassung

Die Sequenzierung der cob-Region der mitochondrialen DNA des Stammes 50 von *S. pombe* brachte folgende Ergebnisse: Das Cytochrom b-Strukturgen wird von einem Intron mit 2526 Basenpaaren Länge unterbrochen, in dem ein offener Leserahmen von 2421 Basenpaaren in Phase mit dem upstream liegenden Exon lokalisiert wurde. Die Insertionsstellen des Introns differieren von den Positionen, an denen die Introns in den cob-Genen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* oder *Neurospora crassa* gefunden wurden. Das *S. pombe*-cob-Intron läßt sich in eine RNA-Sekundärstruktur falten, die fast identisch mit den Faltstrukturen ist, die für die ersten zwei *coxI*-Introns (Gruppe II) in *S. cerevisiae* und das *pl-coxI*-Intron von *Podospora anserina* postuliert werden. Es besitzt die meisten der Consensus-Nukleotide in der Corestruktur, die für diese Gruppe von Introns beschrieben wird. Der Vergleich mit anderen Gruppe II-Introns erlaubt die Identifikation von einer zusätzlichen konservierten Nukleotidsequenz. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen codierender Regionen von Gruppe II-Introns zeigt drei hochkonservierte Blöcke, die Aminosäurehomologien von 34% bis 53% zeigen. Diese Regionen umfassen mehr als 50% der codierenden Länge des Introns, schließen aber nicht die 5'-Region ein, welche ausgeprägte Sekundärstruktur zeigt. Zusätzlich zur potentiellen Intronfaltung lassen sich lange helikale Strukturen in den flankierenden Exonteilen

bilden, die aus repetitiven Sequenzen bestehen. Ein Sequenzvergleich zwischen Cytochrom b von *S. pombe* und verfügbaren Cytochrom b-Genen anderer Organismen zeigt, daß *S. pombe* evolutionär entfernt von Sproß-Hefen und von anderen Ascomyceten ist. Wie schon für das *cox1*-Gen (Lang 1984) gezeigt wurde, werden die *cob*-Exons unter Verwendung des universellen genetischen Codes translatiert, wodurch sich *S. pombe*-Mitochondrien von allen anderen bisher untersuchten Systemen bei Pilzen und Tieren unterscheidet.

Eine Reihe von Mutanten, die phänotypisch durch einen Ausfall von Cytochrom b charakterisiert ist, zeigt in den Exon- und Intronbereichen Deletionen von 32 bis 724 Basenpaaren. An den Deletionsendpunkten von sechs Mutanten befinden sich direkte Sequenzwiederholungen mit Längen von 4 bis 9 Basenpaaren, was auf Deletionsmechanismen wie "Slipped-mispairing" oder illegitime Rekombination schließen läßt. Bei drei identischen Mutanten ohne direkte Repeats fällt der 5'-Deletionsendpunkt exakt mit der 3'-Intron-Exongrenze zusammen. Da auch die 3'-Deletionsendpunkte starke Homologien mit dem 5'-Intron-Spleißpunkt zeigen, lassen sich zusätzliche Mechanismen für Deletionsentstehung annehmen, die im Zusammenhang mit den Mechanismen stehen könnten, die verantwortlich für die basengenaue Deletion von Introns auf DNA-Ebene (Intron-Excision) sind. Dabei könnte eine für Gruppe II-Introns vorgeschlagene Reverse-Transkriptase-Aktivität (Michel und Lang, 1985) eine Rolle spielen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die durch stete Hilfsbereitschaft und Diskussionen am Entstehen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. K. Wolf für wertvolle Ratschläge, stete Bereitschaft zu Diskussionen und sein entgegengebrachtes Verständnis, wodurch eine äußerst angenehme Zusammenarbeit möglich war;

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Genetik und Mikrobiologie, sowie für die Sicherstellung finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft am gemeinsamen Forschungsvorhaben Wolf-Lang;

Herrn Priv. Doz. Dr. B.F. Lang für Betreuung, Diskussionen und Computerauswertung von Ergebnissen;

den beiden "Mitdissertanten" Sonja Distler und Dr. Helga Trinkl, deren Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft ein Arbeiten in angenehmer Atmosphäre ermöglichte.

LEBENS LAUF

Alfred Ahne,
geb. am 27. 11. 1952 in Fridolfing, Kreis Traunstein

1959 bis 1964 Volksschule Fridolfing

1964 bis 1974 Gymnasium Laufen (humanistischer Zweig)
mit Abschluß Abitur

1976 bis 1982 Biologiestudium an der Universität München
mit Abschluß Diplom

1982 bis 1985 Doktorarbeit am Institut für Genetik und
Mikrobiologie der LMU München

V. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahne, F., Merlos-Lange, A. M., Lang, B. F., Wolf, K.
(1984) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 5. Characterization of mitochondrial deletion mutants.
Curr. Genet. 8, 517-524
- Albertini, A. M., Hofer, M., Calos, M. P., Miller, J. H.
(1982) On the formation of spontaneous deletions: The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions.
Cell 29, 319 - 328
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C. Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, J. H., Staden, R. & Young, I. G.
(1982). In Mitochondrial Genes (Slonimski, P. P., Borst, P. & Attardi, G., eds), pp. 5-43, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Anziano, P. Q., Hanson, D. k., Mahler, H. R., Perlman, P. S.
(1982) Functional domains in introns: Trans-acting and cis-acting regions of intron 4 of the cob gene
Cell 30, 925 - 932
- Anziano, P. Q., Perlman, P. S., Lang, B. F., Wolf, K.
(1983) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* I. Isolation and physical mapping of mitochondrial DNA.
Curr. Genet. 7, 273 - 284
- Baldacci, G., de Zamaroczy, M., Bernardi, G.
(1980) Excision sites in the GC clusters of the mitochondrial genome of yeast.
FEBS Letters 114, 234 - 236

Benne, R., de Vries, B. F., van den Burg, J., Klaver, B.
(1984) The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma*
brucei mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene
for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames
Nucl. Acids Res. 11, 6925 - 6941

Bernardi, G., Bernardi, G.
(1980) Repeated sequences in the mitochondrial genome of
yeast.
FEBS Letters 115, 159 - 162

Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W.,
Clayton, D. A.
(1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial
DNA.
Cell 26, 167 - 180

Bonen, L., Boer, P.H. & Gray, M. W.
(1984) The wheat cytochrome oxidase subunit II genes has an
intron insert and three radical amino acid changes relative
to maize
EMBO J. 3, 2531 - 2536

Bonitz, S. D., Coruzzi, G., Thalenfeld, B. E., Tzagoloff, A.
(1980 b) Assembly of the mitochondrial membrane system.
Structure and nucleotide sequence of the gene coding for
subunit 1 of yeast cytochrome oxidase
J. Biol. Chem. 255, 11927 - 11941

Borst, P.
(1980) The optional introns in yeast mitochondrial DNA .
In: Biological chemistry of organelle formation. T. Bücher, W.
Sebald, H. Weiss, eds., pp 27 - 42, Springer Verlag, Berlin -
Heidelberg - New York

Borst, P., Grivell, L. A.

(1978) The mitochondrial genome of yeast.

Cell 15, 705 - 723

Borst, P., Grivell, L. A.

(1981 b) Small is beautiful - portrait of a mitochondrial genome.

Nature 290, 443 - 444

Brown, T. A., Waring, R. B., Scazzocchio, C., Davies, R. W.

(1985) The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome.

Curr. Genet. 9, 113 - 117

Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C.

(1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 76, 1967 - 1971

Burger, G., Schraven, C., Machleidt, W. & Werner, S.

(1982) Subunit 1 of cytochrome oxidase from *Neurospora crassa*: nucleotide sequence of the coding gene and partial amino acid sequence of the protein.

The EMBO Journal 1, 1385 - 1391

Burke, J. M., Breitenberger, C., Heckman, J. E., Dujon, B. & RajBhandary, U. L.

(1984) Cytochrome b gene of *Neurospora crassa* mitochondria. Partial sequence and location of introns at sites different from those in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*.

J. Biol. Chem. 259, 504 - 511

Carignani, G., Groudinsky, O., Frezza, D., Schiavon, E., Bergantino, E., Slonimsky, P. P.

(1983) An mRNA maturase is encoded by the first intron of mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase in *S. cerevisiae*.

Cell 35, 733 - 742

Cech, T.R., Zaug, A.J., Grabowski, P.J.

(1981) In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence

Cell 27, 487 - 496

Chang, A. C. Y. & Cohen, S.N.

(1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid

J. Bacteriol. 134, 1141 - 1156

Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. J.

Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R. F., Attardi, G.

(1985) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase.

Nature 314, 592 - 598

Clark-Walker, G. D., McArthur, C. R., Daley, D. J.

(1981a) Does mitochondrial DNA length influence the frequency of spontaneous petite mutants in yeast ?

Curr. Genet. 4, 7 - 12

Clewell, D. B.

(1972) Nature of Col E plasmid replication in E. coli in the presence of Chloramphenicol

J. Bacteriol. 110, 667 - 676

Davies, R. W., Waring, R. B., Ray, J. A., Brown, T. A. & Scazzocchio, C.

(1982) Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria.

Nature 300, 719 - 724

Dawson, A. J., Jones, V. P. & Leaver, C. J.

(1984) The apocytochrome b gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site

EMBO J. 3, 2107 - 2113.

De la Salle, H., Jacq, C., Slonimski, P. P.

(1982) Critical sequences within mitochondrial introns:

Pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase.

Cell 28, 721 - 732

Dujardin, G., Jacq, C. & Slonimski, P. P.

(1982) Single base substitutions in an intron of oxidase gene compensates splicing defects of the cytochrom b gene.

Nature 298, 628 - 632

Dujon, B.

(1983) In Mitochondria 1983 (Schweyen, R. J., Wolf, K. & Kaudewitz, F., eds), pp. 1 - 24, Walter de Gruyter, Berlin

Engelmann, D. M. & Steitz, T. A.

(1981) The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: The helical hairpin hypothesis

Cell, 23, 411 - 422

Farabaugh, P. J., Schmeissner, U., Miller, J. H.

(1978) Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lac I gene of Escherichia coli.

J. Mol. Biol. 126, 847 - 863

Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Getz, G. S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, H., Dujon, B., Netter, P., Slonimski, P. P.

(1973) Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: deletion and repetition of genes.

Biochimie 55, 779 - 792

Fox, T. D. & Leaver, C. J.

(1981) The Zea mays mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons

Cell, 26, 315 - 323

Gargouri, A., Lazowska, J., Slonimski, P. P.

(1983) DNA-splicing of introns in the gene: general way of reverting intron mutations.

In Mitochondria 1983. (Schweyen, R. J., Wolf, K. & Kaudewitz, F., eds), pp. 259 - 268, Walter de Gruyter, Berlin

Garnier, J., Osguthorpe, D. J. & Robson, B.

(1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting secondary structure of globular proteins

J. Mol. Biol. 120, 97 - 120

Garoff, H. & Ansorge, W.

(1981) Improvements of DNA sequencing gels

Anal. Biochem. 115, 450 - 457

Garriga, G., Lambowitz, A. M.

(1984) RNA splicing in Neurospora mitochondria: self-splicing of a mitochondrial intron in vitro.

Cell 38, 631 - 641

Glickman, B. W., Ripley, L. S.

(1984) Structural intermediates of deletion mutagenesis: a role for palindromic DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, pp. 512 - 516

Grivell, L. A.

(1983) In Mitochondria 1983. (Schweyen, R. J., Wolf, K. & Kaudewitz, F., eds), pp. 22 - 45, Walter de Gruyter, Berlin

Grivell, L. A.

(1983) Mitochondrial DNA

Scientific American 248, 73 - 78

Grivell, L. A., Borst, P.

(1982) Mitochondrial mosaics - maturases on the move.

Nature 298, 703 - 704

Go, M.

(1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin

Nature 291, 90 - 92

Heinemeyer, W., Alt, J. & Herrmann, R. G.

(1984) Nucleotide sequence of the clustered genes for apocytochrome b₆ and subunit 4 of the cytochrome b/f complex in the spinach plastid chromosome

Curr. Genet. 8, 543 - 549

Helmer-Citterich, M. H., Morelli, G. & Macino, G.

(1983) Nucleotide sequence and intron structure of the apocytochrome b gene of *Neurospora crassa* mitochondria.

The EMBO Journal 2, 1235 - 1242

Hensgens, L. A. M., Bonen, L., de Haan, M., Van der Horst, G., Grivell, L. A.

(1983) Two intron sequences in yeast mitochondrial cox 1 gene: Homology among URF - containing introns and strain-dependent variation in flanking exons.

Cell 32, 379 - 389

Hudspeth, M. E. S., Ainley, W. M., Shumard, D. S., Butow, R. A., Grossman, L.

(1982) Location and structure of the var 1 gene on yeast mitochondrial DNA: nucleotide sequence of the 40.0 allele.

Cell 30, 617 - 626

Huysmans, E., Dams, E., Vandenberghe, A. & de Wachter, R.
(1983) The nucleotide sequence of 5S rRNAs of four mushrooms
and their use in studying the phylogenetic position of
basidiomycetes among the eukaryotes
Nucl. Acids Res. 11, 2871 - 2879

Jacquier, A., Dujon, B.
(1985) An intron encoded protein is active in a gene conver-
sion process that spreads an intron into a mitochondrial gene
Cell 41, 383 - 394

Kao, T.-H., Moon, E. & Wu, R.
(1984) Cytochrome oxidase subunit II gene of rice has an
insertion sequence within the intron
Nucl. Acids res. 12, 7305 - 7315

Koch, W., Edwards, K. & Kössel, H.
(1981) Sequencing of the 16S-23S spacer in a ribosomal RNA
operon of Zea mays chloroplast DNA reveals two split tRNA
genes
Cell 25, 203 - 213

Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J.,
Gottschling, D. E., Cech, T. R.
(1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of
the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.
Cell 31, 147 - 157

Kyte, J. & Doolittle, R. F.
(1982) A simple method for displaying the hydropathic
character of a protein.
J. Mol. Biol. 157, 105 - 132

Lang, B. F.

(1984) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: highly homologous introns are inserted at the same position of the otherwise less conserved *cox 1* genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans*.

The EMBO Journal 3, 2129 - 2136

Lang, B. F., Ahne, F., Bonen, L.

(1985) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: The cytochrom b gene has an intron closely related to the first two introns in the *Saccharomyces cerevisiae* *cox 1* gene.

J. Mol. Biol. 184, 353 - 366

Lang, B. F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H., Kaudewitz, F., Wolf, K.

(1983) Sequence of the mitochondrial DNA, arrangement of genes and processing of their transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. In: Mitochondria 1983. R. J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds., pp 313 - 329, Walter de Gruyter, Berlin - New York.

Lang, B. F., Wolf, K.

(1984) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 2. Localization of genes by interspecific hybridization in strain *ade7-50h⁻* and cloning of the genome in small fragments.

Molec. gen. Genet. 196, 465 - 472

Lazowska, J., Jacq, C., Slonimski, P. P.

(1980) Sequence of introns and flanking exons in the wild type and box 3 mutants of the mitochondrial cytochrom b gene reveals an interlaced splicing protein coded by an intron.

Cell 22, 333 - 348

Lazowska, J., Michel, F., Faye, G., Fukuhara, H., Slonimski, P. P.

(1974) Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. II. DNA-DNA hybridization studies and buoyant density determinations.

J. Mol. Biol. 85, 393 - 410

Macino, G.

(1980) Mapping of mitochondrial structural genes in *Neurospora crassa*.

J. Biol. Chem. 255, 10563 - 10565

Macreadie, I. G., Scott, R. M., Zinn, A. R., Butow, R. A.

(1985) Transposition of an intron in yeast mitochondria requires a protein encoded by that intron.

Cell 41, 395 - 402

Maniatis, T., Frisch, E. F. and Sambrook, J.

(1982) Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Maxam, A. M. & Gilbert, W.

(1980) Sequencing end labelled DNA with base-specific chemical cleavages.

Meth. Enzymol. 65, 499 - 560

Michel, F. & Dujon, B.

(1983) Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members.

The EMBO Journal 2, 33 - 38

Michel, F., Jacquier, A., Dujon, B.

(1982) Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure.

Biochimie 64, 867 - 881

Michel, F. & Lang, B.F.

(1985) Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptase of retroviruses
Nature 316, 641-643

Nargang, F. E., Bell, J. B., Stohl, L.L., Lambowitz, A. M.

(1984) The DNA sequence and genetic organization of a *Neurospora* mitochondrial plasmid suggests a relationship to introns and mobile elements.

Cell 38, 441 - 453

Netzger, R., Köchel, H. G., Basak, N., Küntzel, H.

(1982) Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6, cytochrome oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNAs and L-rRNA.

Nucleic Acids Res. 10, 4783 - 4794

Nobrega, F. G., Tzagoloff, A.

(1980) Assembly of the mitochondrial membran system. DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* D273 - 10B.

J. Biol. Chem. 255, 9828 - 9837

Osiewacz, H. D., Esser, K.

(1984) The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene.

Curr. Genet. 8, 299 - 305

Rigby, P. W., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P.

(1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.

J. Mol. Biol. 113, 237 - 251

Russel, P. R. & , B. D.

The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

J. Biol. Chem. 258, 143 - 149

Saraste

(1984) Location of haem-binding sites in the mitochondrial cytochrom b.

FEBS Letters, 166, 367 - 372

Schmelzer, C., Schmidt, C., May, K. & Schweyen, R. J.

(1983) Determination of functional domains in intron bII of yeast mitochondrial RNA by studies of mitochondrial mutations and a nuclear suppressor.

The EMBO Journal 2, 2047 - 2058

Seitz-Mayr, G., Wolf, K.

(1982) Extrachromosomal mutator inducing point mutations and deletions in the mitochondrial genome of fission yeast

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2618 - 2622

Sor, F., Fukuhara, H.

(1983) Unequal excision of complementary strands is involved in the generation of palindromic repetitions of rho⁻ mitochondrial DNA in yeast.

Cell 32, 391 - 396

Southern, E. M.

(1975) Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503 - 517

Steinhilber, W., Cummings, D.

(1985) Reverse transcriptase activity in *Podospora anserina*
Abstract: International Bari Conference (Sept. 1985)

Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., Inouye, M.

(1966) Frameshift mutations and the genetic code.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 77 - 84

Trinkl, H., Lang, B. F., Wolf, K.

(1985) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 7. Continuous gene for apocytochrome b in strain EF1 (CBS 356) and sequence variation in the region of intron insertion in strain *ade7-50h⁻*.

Molec. gen. Genet. 198, 360 - 363

Tzagoloff, A., Macino, G., Sebald, W.

(1979) Mitochondrial genes and translation products.

Ann. Rev. Biochem. 48, 419 - 441

Waring, R. B., Davies, R. W., Lee, S., Grisi, E., Berks, M. M., Scazzocchio, C.

(1981) The mosaic organization of the apocytochrome b gene of *Aspergillus nidulans* revealed by DNA sequencing.

Cell 27, 4 - 11

Waring, R. B., Davies, R. W., Scazzocchio, C., Brown, T. A.,

(1982) Internal structure of a mitochondrial intron of

Aspergillus nidulans.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6332 - 6336

Waring, R. B., Brown, T. A., Ray, J. A., Scazzocchio, C., Davies, R. W.

(1984) Three invariant introns of the same general class in the mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit 1 in *Aspergillus nidulans*.

The EMBO Journal 3, 2121 - 2128

Weiss-Brummer, B., Rödel, G., Schweyen, R. J., Kaudewitz, F.
(1982) Expression of the split gene cob in yeast: Evidence for
a precursor of a "maturase" protein translated from intron 4
and preceding exons.

Cell 29, 527 - 536

Widger, W. R., Cramer, W. A., Herrmann, R. G., Trebst, A.
(1984) Sequence homology and structural similarity between
cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast
b_L-f complex

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 81, 674 - 678

Yaffe, M., Schatz, G.

(1984) The future of mitochondrial research.

TIBS, April 1984, 179 - 181

-200 TTCAATTCCCTAAATTAGCAATCCCTTTCCCATATTTTGGTAAAGAGGATCTCAGATAGTATCAACTCTTCTTATTATCCAAATCCCTT
 -100 TAATAAGATTGGATCTTTTCCCAATTCCTTCAAAATTTTGACTATTTATCGATGAATGTTTCAATTTAGAAAGGCAATTTCAAAATTAATTTT
 1 MET LYS ILE LEU LYS SER ASN PRO PHE LEU ALA LEU ALA ASN ASN TYR MET ILE ASP ALA PRO GLU PRO SER ASN
 ATG AAA ATT TTA AAA TCT AAT CCT TTT TTA GCT TTG GCT AAT AAT TAT ATG ATT GAT GCT CCT GAA CCT TCA AAT
 76 ILE SER TYR THR TRP ASN PHE GLY SER LEU LEU ALA CYS VAL LEU VAL ILE GLN ILE VAL ILE GLY ILE LEU LEU
 ATT TCA TAC TTC TGG AAT TTT GGT TCT CTT TTA GCT TGT GTA TTA GAT ATT GAT AAT TTA GCT TCA CTT TTA
 151 ALA CYS PHE TYR ILE PRO ASN MET ASP LEU ALA PHE LEU SER VAL GLU ARG ILE VAL ARG ASP VAL ASN TYR GLY
 GCT TGT TTT TAT ATT CCT AAT ATG GAT TTA GCT TTC CTT TCA GTT GAA GAA AAT GTT AGA GAT GTA AAT TAT GGT
 226 PHE LEU LEU ARG ALA PHE HIS ALA ASN GLY ALA SER PHE PHE PHE ILE PHE LEU HIS ILE PHE LEU ARG GLY
 TTC TTA TTA AGA GCT TTC CAT GCA AAT GGT GCT AGT TTC TTC TTT ATC TTC TTA TCA TCA AAT GGT AGA GGT
 301 LEU TYR TYR GLY SER TYR LYS TRP PRO ARG THR MET THR TRP ASN ILE GLY ILE ILE PHE LEU THR ILE
 TTA TAT TAT GGT TCT TAT AAA TAT CCA AGA ACA ATG ACA TGG AAT ATT GGT GGT ATT ATC TTC TTA TTA ACT ATT
 376 ILE THR ALA PHE LEU GLY TYR CYS LEU PRO ALA ASN GLN MET SER PHE TRP GLY ALA THR VAL ILE THR ASN LEU
 ATT ACT GCC TTT TTA GGT TAC TGT TTA CCA GCT AAT CAA ATG TCA TCA TGG GGT GCA ACT GTT ATT ACT AAT TTA
 451 LEU SER ALA VAL PRO PHE ILE GLY ASP ASP LEU VAL HIS LEU LEU TRP GLY GLY PHE SER VAL SER ASN PRO THR
 TTA TCA GCT GGT CTT TCT TTT GGT GAT GAT TTA GTT CAT CTA TTA TGG GGT GGA TTT GGT ATG TCT AAT CCT ACT
 526 LEU ASN ARG PHE PHE SER LEU HIS TYR LEU MET PRO PHE VAL ILE ALA ALA LEU SER VAL MET HIS LEU ILE ALA
 TTA AAT AGA TGC TTC TCA CTT CAT TAT TTA ATG CCT TTT GTT ATT GCT GCT TTA TCA GTA ATG CAT TTA TAT GCT
 601 LEU HIS THR ASN GLY SER SER ASN PRO LEU GLY VAL THR ALA ASN MET ASP ARG ILE PRO MET ASN PRO TYR TYR
 CTA CAT ACT AAT GGT TCA TCA AAT CCA TTA GGT GTA ACA GCT AAT ATG GAC AGA ACT CCA ATT AAC CCG TAT TAT
 676 LEU ILE LYS LEU ARG ARG CYS GLY ILE TYR VAL TYR PRO HIS ARG GLU ARG ASP ILE LEU CYS VAL LYS ILE TRP
 CTG ATA AAA TGG CCG CCT TGT GGT ATA TAT GTG TAC CCT CAT AGA GAA AGG GAT TGT GTT GTA AAG ATA TGA
 751 thr ile his leu ser ser trp gly ser pro met pro asn arg ala cys val gln lys val leu pro val thr lys
 ACA ATA CAC TTA GGT AGC TGG GGA AAC CCA ATG CCG AAC AGA GCA TGT GTA CAG AAG GTC CTT CCT GTA ACG AAA
 826 gln ile ser ser asp gly ser val gln ile asp thr val arg ala val leu pro glu phe gln phe pro ser his
 CAG ATA AGT TCA GAT GGA TCA GGT TTT CAA ATA GAT AGC GTT AGA GCT GTA TTT CCA TTT CCA TTC CCA TCT CAC
 901 pro gln ile gly asp cys leu ser trp ile glu thr phe phe ser arg ser gln lys phe thr asp gln gly
 CCT CAG ATA GGT GAT TCT AGC TGA ATA GAG ACA TTC TTC TCT AGA TCT TTT GGT GGT TTT TAT GAC CAA GGA
 976 tyr thr pro gly glu glu ser cys thr asn ser thr ile lys gly met ser gly lys pro thr ser ile ile ser
 TAC ACA CCA GGA GAA GAG AGT TGT ACC AAT AGT ACA ATT AAG GGA ATG AGT GGA AAT CCT AGC TCT ATC ATC TCA
 1051 asn ile tyr thr thr thr thr gly pro ala lys val ser asn asp tyr ala val arg asp pro gly val ala val asp
 AAC TAT ACT TCA ACT AGC GGT CCC GCT AAG GTC AGT AAT GAC TAT GCG GTC AGA GAT CCT GGA GTA GCT GTT GAT
 1126 his phe asp gln tyr gly pro leu lys glu gly arg ser leu asn ser ala lys ile ser thr gln trp ser gly
 CAT TTT GAT CAA TAC GGT CCT TTG AAA GAG GGA AGA AGT TTG AAC TCT GCA AAG ATT TCA ACA CAG TGA AGT GGA
 1201 ser ala thr leu leu ser ser asn arg ser ile phe asn ile gly leu gly tyr ile asn thr phe gln val
 TCA GCT ACA TTA AAG TCT TCC AAT AGA TCA ATA TTT AAT ATT GGT TTA GGA TAC ATT AAT ACT TTT TTA GGG GTA
 1276 ser asn val arg gly phe ser thr gly ser gly arg ser lys asn val leu asn lys leu asp asp leu ser lys
 TCT AAT GTA AGA GGA TTT AGT ACA GGA TCA GGA CCA TCA AAA AAT GTA CTA AAT AAA CTA GAC GAT TTA TCT AAA
 1351 arg ser lys asn tyr pro asn leu val ile asp arg asn leu tyr lys asp phe leu leu asn arg asp met phe
 CGA TCA AAA AAT TAT CCT AAT CTT GTA ATT GAT AGA AAT CTC TAC AAA GAT TTC CTA TTA AAT CGA GAT ATG TCT
 1426 leu ile ala tyr asn lys leu lys ser asn pro gly met met thr his gly leu lys pro asp thr leu asp gly
 CTT ATT GCT TAT AAT AAA TTA AAA TCT AAT CCT GGT ATG ATG ACT CAT GGT CTT AAA CCG GAT ACT TTA GAT GGA
 1501 met ser ile asp val ile asp val ile gln ser leu lys ser glu glu phe asn phe thr pro gly arg arg
 ATG TCT ATA GAT GTT ATT GAT AAA ATT ATC CAA AGC CTT AAA TCT GAA GAA TTT AAC TCT ACT CCT GGT AGA GGT
 1576 ile leu ile asp lys ala ser gly gly lys arg pro leu thr ile gly ser pro arg asp lys leu val gln glu
 ATC TTA ATT GAT AAA GCC AGT GGT GGA AAA AGA CCA TTA ACA ATT GGT AGT CCT CGA GAC AAA TTA GTT CAA GAA
 1651 ile leu arg ile val leu ala ile tyr glu pro leu phe asn thr ala ser his gly phe arg pro gly arg
 ATT CTT AGA ATA GCT CTT GAG GCT ATC TAT GAA CCA TTA TTT AAT ACT GCT TCT CAT GGA TTT AGA CCA GGT CGA
 1726 ser cys his ser ala leu arg ser ile phe thr asn phe lys gly cys thr trp trp ile glu gly asp ile lys
 AGT TGT CAT TCT GCT CTT AGA TCT ATT TTC ACT AAT TTT AAA GGT GGT ACT TGG TGG ATT GAA GGA GAT ATT AAA
 1801 ala cys phe asp ser tle pro his asp gat lys leu ile ala leu leu ser lys ile lys asp gln arg phe ile
 GCT TGT TTT GAT TCT CCT CCT CAT GAT AAA TTA ATT GCT CTA TTA TCT TCT AAA ATT AAA GAT CAA CGA TTT ATT
 1876 gln leu ile arg lys ala leu asn ala gly tyr leu thr glu asn arg tyr lys tyr asp ile val gly thr pro
 CAA TTA ATT COT AAA GCT TTA AAT GCT GGA TAT CTA ACT GAA AAT AGA TAT AAA TAC GAT ATT GTT GGA ACT CCT
 1951 gln gly ser phe val ser ile leu ala asn ile tyr leu his gln leu asp glu phe ile glu asn leu lys
 CAA GGT TCT ATA GTT AGT COT ATC TTA GCA AAT ATC TAC CTT CAT CAA TFG GAT GAA TTT ATT GAA AAC CTA AAA
 2026 ser glu phe asp tyr lys glu pro ile ala arg lys arg thr ser glu ser arg his leu his tyr leu met ala
 TCA GAA TTT GAT TAC AAA GGT CCA ATA GCT COT AAA AGA ACT TCT GAA TCT AGA CAT CTT CAT TAT CTA ATG GCA
 2101 lys ala lys arg glu asn ala asp ser lys thr ile arg lys ile ala ile glu met arg asn val pro asn lys
 AAA GCC AAA AGA GAA AAT GCT GAT TCA AAA ACA ATT AGA AAA ATA GCG ATT GAA ATG COT AAT GGT CCT AAT AAG
 2176 ile his gly ile gln ser asn lys leu met tyr val arg tyr ala asp asp trp ile val ala val asp gly ser
 ATA CAT GGT ATT CCA TCT AAT AAA CTA ATG TAT GTT CGA TAC GCT GAT GAT TGG ATA GTT GCA GAT AAT GGA AGT
 2251 tyr thr gln thr lys glu ile leu ala lys ile thr cys phe cys ser ile gly leu thr val ser pro thr
 TAT ACT CAA ACT AAA GAG ATT TTA GCT AAA ATT ACC TGT TTC TGT TCA TCA ATT GGA CTA ACA GTA TCT CCA ACT
 2326 lys thr lys ile thr asn ser tyr thr asp lys ile leu phe leu gly thr asn ile ser his ser lys asn val
 AAG ACT AAA ATA ACT AAT TCA TAT ACG GAT AAA ATA CTT TTC CTT GGT ACT AAT ATT AGC CAT TCT AAA AAT GTT

Exon 1

Intron

2401 thr phe ser arg his phe gly ile leu gln arg asn ser gly phe ile leu leu ser ala pro met asp arg ile
 ACC TTT AGT AGA CAT TTT GGT ATA CTT CAA AGA AAT TCT GGG TTT ATT TTA CTT TCT CCT CCT ATG GAT CGA ATT
 2476 ala lys lys leu arg glu thr gly leu met leu asn his lys gly arg ser val ile arg trp leu pro leu asp
 GCA AAA AAA CTT AGA GAA ACT GGA CTT ATG CTT AAT CAT AAA GGT AGA TCT GTT ATT AGA TGG TTA CTT CTT GAT
 2551 val arg gln ile ile gly leu ala asn ser ile ile arg gly tyr asp asn tyr tyr ser phe val his asn arg
 GTA CGA CAA ATT ATT GGT TTA GCG AAT TCT ATT ATT AGA GGT TAC GAT AAT TAT TAT TCT TTT GTT CAT AAT AGA
 2626 gly arg phe ala thr tyr val tyr phe ile ile lys asp cys val leu arg thr leu ala his lys leu ser leu
 GGA AGA TTT GCT ACT TAC GTT TAC TTC ATA ATT AAA GAC TGT GTT CTT CGA ACA TTA GCT CAT AAA TTA TCA TTA
 2701 gly thr arg met lys val ile lys lys phe gly pro asp leu ser ile tyr asp tyr asn ser arg asp glu asn
 GGT ACT AGA ATG AAA GTA ATT AAA AAA TTT GGT CCT GAC CTT TCT ATC TAT GAT TAC AAC TCT AGA GAT GAA AAT
 2776 asn lys pro lys leu ile thr gln leu phe lys pro ser trp lys val asn val trp gly phe lys ser asp lys
 AAT AAA CCA AAA TTA ATT ACC CAA TTA TTT AAA CCT TCT TGG AAA GTT ATT TGT GGA TTT AAA TCT GAC AAA
 2851 val lys leu asn ile arg thr leu tyr ala ser his leu ser met ala asn leu glu asn leu gln cys ala ala
 GTT AAA TTG AAC ATT AGA ACA CTT TAT GCT TCT CAC TTA TCA ATG GCT AAC TTA GAA AAT CTA CAG TGT GCT GCT
 2926 cys gln ser thr tyr lys val glu met his his val arg gln met lys asn leu lys pro ile lys gly thr leu
 TGT CAA AGT ACT TAT AAA GTG GAA ATG CAT CAT GTT AGA CAG ATG AAA AAT CTT AAA CCA ATC AAA GGT ACT TTA
 3001 asp tyr leu met ala lys ala asn arg lys gln ile pro leu cys arg ser cys his met lys leu his ala asn
 GAT TAC TTA ATG GCA AAA GCA AAC AGA CAA ATT CCA TTA TGT AGA TCT TGT CAC ATG AAA CTT CAT GCT AAT
 3076 lys leu thr leu asn glu asp lys lys val ter
 AAG TTA ACT CTT AAT GAG GAT AAA AAA GTT TAG ATATCTTAATGTAGTGAGAGCCGTATAATTACGAAAGTATCCGTCAGGTTCTG
 3164 GTACAGACGCGGTGCAACCCCTGCAAAAGGGAATGCGTCTAGTTCAAT
 3250 TYR MET ALA PHE TYR ASN PRO TYR GLY PHE MET GLU PRO ASP CYS ALA LEU PRO ALA ASP PRO LEU LYS THR PRO
 TAT ATG GCA TTC TAT AAT CCA TAT GGA TTT ATG GAA CCA GAT TGT GCT TTA CCA GCG GAT CCT CTA AAA ACT CCA
 3325 MET SER ILE VAL PRO GLU TRP TYR LEU LEU PRO PHE TYR ALA ILE LEU ARG ALA ILE PRO ASN PHE GLN LEU GLY
 ATG TCT ATT GTT CCA GAA TGG TAT TTA TTA CTT TCT TAT GCT ATT TTA AGA GCT ATA CCT AAC TTC CAA TTA GGA
 3400 VAL ILE ALA MET LEU LEU SER ILE LEU VAL LEU LEU LEU PRO LEU LEU ASP PHE SER ALA ILE ARG GLY ASN
 GTT ATA GCA ATG TTA TTA CTA ATC TTA TTA CTA TTA TTA CCA TTA TTA GAT TGT TCA GCT ATT AGA GGT AAT
 3475 SER PHE ASN PRO PHE GLY LYS PHE PHE TRP THR PHE VAL ALA ASP PHE VAL ILE LEU ALA TRP ILE GLY GLY
 AGT TTT AAG CCA TTT GGT AAA TTC TTC TCG ACA TTT GTT GCC GAT TTT GTA ATT CTT CCA TGG ATT GGT GGA
 3550 SER HIS PRO GLU ASN VAL PHE ILE THR ILE GLY ALA ILE ALA THR ILE PHE TYR PHE SER TYR PHE PHE ILE LEU
 TCA CAT CCA GAA AAC GTC TTT ATC ACA ATC GGT GCT ATT GCT ACA ATC TTC TAT TTT AGC TAC TTC TTT ATT TTA
 3625 ILE PRO VAL TYR THR ILE LEU GLY ASN THR LEU ILE ASP LEU ASN LEU SER SER ILE LYS ARG TER
 ATA CCA GTA TAT ACT ATA TTA GGT AAT CCA TTA ATT GAT TTA AAT TTA AGC TCA ATT AAA CGA TAA TCTCTTCCCCCT
 3702 TTACACTATATAAAAATATCTATTTTAAACAGTATAATTTAATAAAAGCTCATCAAAGGTATGAATAAAAGTTTTCATACATAGATTAGTAAATAA

Intron

Exon 2

Abb. 3: DNA Sequenz der ccb-Region von *S. pombe*

In Abb. 3 ist die DNA-Sequenz des cob-Gens mit seinem Intron dargestellt. Die Nummerierung (Base 1) beginnt am Initiationscodon im Exonbereich 1. Die angenommenen Spleißpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Translatierte Aminosäuren der zwei Exons sind in Großbuchstaben, die des Intronsleserahmens in Kleinbuchstaben dargestellt. Für die Übersetzung der Nukleotidsequenz in Aminosäuren wurde der Code für mt DNA in *N. crassa* verwendet, da sich damit höchstmögliche Homologien zu anderen cob-Sequenzen erreichen lassen (siehe Lang, 1984) und weil die Zuordnung der meisten Codons in *N. crassa* direkt durch Proteinsequenz-Analyse (Burger et al., 1982) überprüft wurde.

